



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final Presentado para Optar al Grado de Médico Veterinario

Modalidad: Trabajo de Investigación

“Monitoreo de rinitis atrófica mediante distintas técnicas diagnósticas”

ALUMNO: GARCIA MYRNA VICTORIA

D.N.I. 36414999

DIRECTOR: TAMIOZZO PABLO
CODIRECTOR: PABLO CAMACHO
RIO CUARTO – CORDOBA

DICIEMBRE 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: “Monitoreo de rinitis atrófica mediante distintas técnicas diagnósticas”

Autor: García Myrna Victoria

DNI: 36414999

Director: Dr., Mar. M.V. Tamiozzo Pablo

Co-Director: Mag. M.V. Pablo Camacho

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

(Nombres) _____

Fecha de Presentación: ____/____/____

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer y dedicar este trabajo especialmente a las personas que me brindaron su apoyo para que su realizacion pueda ser posible.

En primer lugar a Manuel Gonzalez responsable de área de sanidad de Yanketruz, que me brindó su apoyo, experiencia y todo lo que estuvo a su alcance para colaborar en este trabajo desde el primer dia. De igual manera a Leonardo Merlo encargado del Sitio 2 por su colaboración y predisposicion, y a todo el personal de la granja, ya que son un gran equipo y fue una gran experiencia trabajar con ellos.

Por otro lado, a todo el grupo de Salud Porcina de la UNRC por su gran predisposicion, en especial a Pablo Tamiozzo por guiarme en este trabajo y a Pablo Camacho por sus enormes aportes.

Al cerrar esta etapa no puedo dejar de agradecer a mi familia, mis padres Victor Garcia y Myrna Agüero por la confianza, el amor, y acompañamiento de todos estos años, sin ellos no hubiera sido posible

A mi salvavidas personal, Mariel Garcia, y mi segundo pilar Franco Garcia, mis dos eternos compañeros de vida, GRACIAS!

Agradecer a las amigas que me regalo la UNRC, que desde el primer dia me acompañaron y compartimos este hermoso camino e hicieron que tenga otro color.

Por último dedicar este trabajo a mis abuelos Elia de los Ángeles Toledo y Rubén Amado Agüero, sin dudas, sé que estarían muy orgullosos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Anatomía y fisiología de la cavidad nasal	1
1.2. Microbiota de la cavidad nasal	2
1.3. Agentes que producen rinitis en cerdos	3
1.4. Rinitis Atrófica	3
1.5. Herramientas diagnósticas para Rinitis Atrofica	6
1.5.1. Monitoreo Clínico	6
1.5.2. Radiografía y tomografía computada	6
1.5.3. Serología	7
1.5.4. Aislamiento bacteriano	7
1.5.5. Diagnóstico molecular	7
1.5.6. Monitoreo en frigorífico	8
1.6. Control de la RA	8
1.7. Tratamiento antibiótico	9
1.8. Vacunación	9
1.9. Medidas de manejo	9
1.10. Importancia económica de la RA	10
2. HIPÓTESIS	11
2.1. OBJETIVO GENERAL	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. La granja: breve descripción de las instalaciones y el plan sanitario	12
3.2. Monitoreo clínico	15
3.3. Monitoreo anatomopatológico	16
3.3.1. Monitoreo en recría (Sitio II)	16
3.3.2. Monitoreo en frigorífico	16

3.4. Toma de muestras	18
3.4.1. Toma de muestra de Fluidos Orales	18
3.4.2. Toma de muestra de hisopados nasales	20
3.5. Procesamiento de muestras	20
3.5.1. Fluidos orales	20
3.5.2. Hisopados nasales	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Monitoreo clínico	22
4.2. Monitoreo anatomopatológico	23
4.3. Bacteriología	25
4.4. Diagnóstico molecular	26
5. DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES	31
7. BIBLIOGRAFIA	32
8. ANEXOS	36

1. INTRODUCCION

1.1. Anatomía y fisiología de la cavidad nasal

Es conveniente conocer la configuración normal de la cavidad nasal, particularmente la de los cornetes nasales para poder estimar su deformidad en caso de rinitis atrófica (RA). El hocico es una proyección que se funde con el labio superior. La extremidad rostral del tabique nasal está osificada y forma el hueso del rostro. Los cartílagos forman el armazón de la cavidad nasal y llegan a la escotadura nasomaxilar (Dyce et al., 1999). La cavidad nasal es larga, estrecha y está separada por un septo nasal amplio, queda dividida en tres meatos nasales por dos cornetes nasales (Sørensen et al., 2006). El cornete dorsal es delgado en la parte rostral pero poco a poco aumenta de diámetro en sentido caudal, se proyecta ventralmente y hacia adentro para formar la pared dorsolateral de la cavidad nasal, de manera que su borde ventral se sitúa hacia medial con respecto a la parte dorsal del cornete ventral (Adams, 1990; Van Alstine, 2012). El cornete ventral es mucho mayor que el dorsal y se adelanta rostralmente. Las paredes de los cornetes están recubiertas de mucosa que se engrosa localmente por la presencia de plexos vasculares. La mucosa nasal se adhiere al periostio. El grosor de la mucosa varía con el grado de congestión vascular, cuando los vasos están muy congestionados impiden notablemente el paso de aire, provocando sensación de “taponamiento” que se asocia con el catarro nasal (Adams, 1990; Van Alstine, 2012). La región vestibular de la cavidad nasal está recubierta por epitelio escamoso estratificado. El resto de la cavidad nasal está revestida por epitelio ciliado pseudoestratificado con células caliciformes productoras de moco. El sistema respiratorio modifica el aire que entra antes de que este acceda a las vías respiratorias inferiores como un mecanismo de protección. Por su paso por la mucosa lo calienta, ya que la misma está muy vascularizada. También el aire se humedece por la evaporización de las lágrimas y de la secreción nasal serosa y se limpia por el contacto con las secreciones de las numerosas y dispersas glándulas mucosas, las cuales extienden una alfombra de moco sobre la mucosa nasal que atrapa las partículas y gotitas que entran y se ponen en contacto con ella. Mediante los cilios del epitelio que reviste la mucosa, el moco pasa a la faringe para ser deglutidos o expectorados. (Dyce et al., 1999; Van Alstine, 2012). El estornudo también es un reflejo que forma parte de un mecanismo de defensa, ocurre gracias a una red de nervios sensoriales que detectan estímulos irritantes, están ubicados desde la nariz hasta la parte inferior de las vías respiratorias (Geppetti et al., 2010). La defensa contra la invasión de microorganismos y otras partículas extrañas es

proporcionada por las estructuras anatómicas y por mecanismos inmunológicos (Dyce et al., 1999; Van Alstine, 2012).

1.2. Microbiota de la cavidad nasal

El tracto respiratorio superior es el hábitat natural de muchos patógenos potenciales, incluidos virus, micoplasmas, clamidias y muchas otras bacterias. La mucosa nasal de los lechones está colonizada por una serie de bacterias muy rica y diversa como parte de su microbiota. Ésta muestra una evolución notable durante las primeras siete semanas de vida. Son importantes porque proporcionan una primera línea de defensa contra los invasores extranjeros ya que la competencia y la interacción entre las bacterias pueden proteger a un huésped de colonizarse con patógenos particulares. Sin embargo, la inestabilidad de la microbiota durante la vida temprana significa que puede ser más susceptible a la disbiosis, que puede crear predisposiciones a otras enfermedades (Munyaka et al., 2014).

La flora bacteriana de cerdos vivos y sanos que se consideran patógenos potenciales o secundarios incluye *M. hyorhinis*, estreptococos spp. (no hemolíticos, alfa-hemolíticos), varias especies de estafilococos, *Escherichia coli* (E. coli), *Klebsiella* spp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Bordetella bronchiseptica* (Bb), *Haemophilus parasuis* y *Pasteurella multocida* (Pm) (Hansen et al., 2010). Esta microbiota en cerdos jóvenes en desarrollo es particularmente vulnerable a variaciones asociadas principalmente con el estrés, la dieta, las prácticas de manejo y los compuestos antimicrobianos (Schokker et al., 2015). Estas variaciones pueden provocar impactos a largo plazo afectando la susceptibilidad a determinadas enfermedades y el rendimiento del crecimiento. Se sabe que de los agentes causantes de RA porcina, Pm es un microorganismo habitante y comensal de membranas y mucosas de las vías respiratorias altas, cavidad oral, tracto genital y digestivo de mamíferos y aves. Es importante tener en cuenta a la microbiota de cada mucosa cuando se utilizan herramientas diagnósticas como el aislamiento. Los cultivos bacteriológicos de la rinofaringe pueden ser de difícil interpretación debido a que no siempre se obtiene una clara idea del origen de la patología: la microbiota es variada y comprende tanto bacterias aerobias como anaeróbicas y hongos. Por ello la obtención de microorganismos potencialmente patógeno de las vías respiratorias; debe considerarse en el contexto de microorganismos normales. El desafío microbiológico consiste en definir cual de los microorganismos aislados de una muestra clínica participa de la enfermedad. Es necesario el aislamiento de un germen nativo en tres muestras de un mismo sitio para atribuirle valor

diagnóstico al hallazgo y atribuirle categoría de agente causal de infección.

1.3. Agentes que producen rinitis en cerdos

Cuando se investiga rinitis en cerdos, uno de los principales pasos a seguir consta en hacer los posibles diagnósticos diferenciales de las posibles causas de afecciones en la cavidad nasal. El estornudo en lechones es a menudo el primer signo clínico de RA, pero también resulta de la infección con otros patógenos que produce rinitis aguda. Entre estos agentes se encuentran virus, bacterias y elementos abióticos. Dentro de los virus, los que pueden causar rinitis son el virus de la Enfermedad de Aujeszky, el citomegalovirus porcino y el virus de influenza porcina (Yoon y Edington 2006). De las bacterias, las principales agentes causales de rinitis son Bb y Pm, que serán vistas en detalle más adelante y entre los agentes abióticos, el amoníaco ha sido informado como agente causal de rinitis y empeorar los cuadros bacterianos (Urbain et al., 1994)

1.4. Rinitis Atrófica

La RA del cerdo es una enfermedad infecciosa respiratoria crónica, ampliamente prevalente de las poblaciones porcinas, que se caracteriza por provocar rinitis y atrofia de los cornetes nasales. Se reconocen dos formas, una grave e irreversible, denominada “rinitis atrófica progresiva” (RAP), que es causada por cepas toxigénicas Pm ya sea sola o en combinación con Bb (Jong y Nielsen 1990).

Por otro lado Bb sola también puede causar rinitis y atrofia de cornetes en cerdos jóvenes acompañada de efectos menores sobre el crecimiento, pero esta condición reversible, conocida como rinitis atrófica no progresiva (RANP) es distinta de RAP. Es muy prevalente en los países con gran producción de cerdos donde la prevalencia de la infección supera ampliamente a la presencia de cuadro clínico. Este agente ingresa principalmente por la introducción de cerdos portadores. Por ello, las cerdas portadoras juegan un papel determinante al transmitir ambas bacterias durante la fase de lactación a su descendencia. En cuanto a la transmisión entre compañeros de corral, se da por aerosoles. La mayor eliminación de ambas bacterias tiene lugar a las 2-3 semanas posteriores al destete, la infección se puede potenciar y diseminar rápidamente entre la población tanto de madres como de lechones susceptibles y dar lugar a un cuadro clínico de rinitis atrófica progresiva o regresiva, con el agravante de que el

mismo suele aparecer en edades más tardías (Brockmeier et al., 2012). Los lechones de madres portadoras son infectados a partir de la segunda semana de vida (máximo a las seis semanas), mientras que si estas cerdas están vacunadas contra Bb y Pm toxigénica, las posibilidades infectivas se trasladan a las 14-18 semanas de vida, donde el desarrollo de la RAP ya no es factible en producción intensiva con sacrificio a las 22-25 semanas de vida. El grado de daño o inflamación epitelial depende del estadio de la enfermedad y si está presente la coinfección con Bb (Elling y Pedersen, 1985). La colonización de la mucosa nasal por los agentes etiológicos y la producción de las lesiones características de RA dependen de la edad ya que la infección por Bb debería tener lugar durante las primeras semanas de vida para dar lugar a atrofia notable de los cornetes (de Jong y Akkermans, 1986) mientras que, bajo condiciones predisponentes, Pm puede producir atrofia de los cornetes leve a moderadas con éxito incluso a la edad de 12-16 semanas (de Jong, 1999) pero los cerdos infectados durante las primeras semanas de vida con Pm toxigénica son los más gravemente afectados con RAP.

La enfermedad más grave generalmente se asocia con sistemas intensivos confinados de producción que tienen una alta densidad de población, poca higiene y mala ventilación. La exposición a altos niveles de polvo y amoníaco puede facilitar la colonización del tracto respiratorio superior por Pm y/ o exacerbar la enfermedad. La patogénesis de Bb depende de factores de virulencia, que incluyen adhesinas, toxinas y otros productos bacterianos que pueden alterar las funciones del huésped, facilitar la evasión inmune o ayudar a la transmisión o la supervivencia. Los microorganismos muestran una adherencia preferencial a las células ciliadas. En el tracto respiratorio, Bb expresa dos toxinas, una toxina dermonecrótica (TDN) que ejerce efectos pleiotrópicos, esencial para el desarrollo de neumonía y atrofia de cornete en cerdos (Brockmeier et al. 2002) y una toxina bifuncional, la adenilato ciclasa (TAC), también contribuye a la virulencia al alterar las funciones inmunoprotectoras innatas (Harvill 1999). Por otro lado, la elaboración por Pm de una toxina conocida como toxina Pm (TPM), es el factor de virulencia esencial de la patogénesis de RAP. Esta toxina produce progresivo acortamiento del hocico, lesiones y atrofia del cornete, lesiones en el hígado, y el tracto urinario caracterizado por degeneración y cambios hiperplásicos. La toxina interfiere con la remodelación normal y formación de hueso en los y puede contribuir a un crecimiento lento asociado con RAP.

Los signos clínicos varían mucho entre los cerdos infectados con Bb dependiendo de la edad, el estado inmune y la coinfección con otros patógenos. Suelen aparecer entre las 4 y 12 semanas de edad, alrededor de 2-3 días después de la infección. Los primeros signos en aparecer se asocian con una rinitis catarral aguda y bronquitis y son incluidos estornudos, resoplidos,

secreción nasal serosa a mucopurulenta, secreción ocular y tos seca y repetida (Pedersen y Barfod 1981). Estas manifestaciones clínicas son comunes entre la RAP y la RANP. La epistaxis presente en casos más graves, es un signo presente mayormente en RAP tras episodios de estornudos violentos.

En cuanto a las lesiones, la atrofia de los cornetes ventrales y dorsales, presentes en variables grados, es la lesión que caracteriza esta enfermedad. En casos leve a moderado, los cornetes ventrales son los más ampliamente afectados y esta condición se la asocia generalmente a RANP; en casos severos pueden dar progreso a la pérdida total de los cornetes, la desviación del tabique nasal, curvatura del hocico, braquignatismo superior. Estas lesiones generalmente se observan en infecciones mixtas con cepas toxigénicas de Pm (de Jong y Nielsen 1990) que produce una variedad de cambios degenerativos en los cornetes ventrales: hiperplasia epitelial, atrofia de las glándulas mucosas, aumento en el volumen de los vasos sanguíneos, osteólisis, y una proliferación de las células mesenquimales las cuales eventualmente reemplazan las trabéculas del hueso y tejidos osteogénicos (Pedersen y Elling 1984). Dependiendo de la etapa de la enfermedad aguda, subaguda o crónica, en el momento de la necropsia, se pueden observar diferentes cambios histológicos.

1.5. Herramientas diagnósticas para Rinitis Atrofica

El diagnóstico definitivo de enfermedades respiratorias para los porcinos como así también para otras especies, se basa en una combinación de antecedentes epidemiológicos, observaciones clínicas, necropsias, evaluaciones de lesiones macroscópicas y microscópicas y pruebas de laboratorio (serológicas, de aislamiento y moleculares), y puede incluir controles de matanza. Para el diagnóstico de certeza es necesaria la detección directa del agente patógeno.

Un diagnóstico definitivo de RA depende de las observaciones clínicas, patológicas y de la demostración de Pm toxigénica y Bb. Se requieren el cultivo de hisopos nasales (Pedersen y Nielsen, 1983), también se puede utilizar la PCR para la detección de ambas bacterias directamente de hisopados nasales (Markowska-Daniel et al., 2009).

1.5.1. Monitoreo Clínico

El monitoreo clínico es un seguimiento en el tiempo de signos clínicos presentes en una población que puede ser realizado por un veterinario o encargado de granja previamente

capacitado, necesitando un protocolo definido que permita obtener datos confiables en el tiempo, si posteriormente estos resultados se combinan con PCR o aislamientos permitiría un conocimiento preciso de la dinámica de la enfermedad y del agente infeccioso en la pira, esencial para una exitosa medida de prevención y control de la enfermedad.

Entre los principales signos respiratorios que se pueden observar tenemos: deformación nasal, estornudo, tos y dificultad respiratoria también podemos sumar a estos la secreciones nasales y oculares con sus diferentes características, serosas, mucosa, y muco-purulentas (Baadsgaard y Jørgensen 2003).

1.5.2. Radiografía y tomografía computada

Pueden proporcionar observaciones objetivas de animales vivos y no son técnicas invasivas, pero requieren que los cerdos sean sedados o físicamente inmovilizados. La tomografía revela cambios más sutiles que pueden no ser evidentes por la radiografía (Magyar et al., 2003). Aunque ambas técnicas constituyen herramientas de diagnóstico valiosas, son caras, requieren equipamiento especializado y no son utilizadas de manera rutinaria.

1.5.3. Serología

Las cepas toxigénicas y no toxigénicas de Pm comparten muchos antígenos de reacción cruzada, y en la actualidad, no existen pruebas serológicas satisfactorias para la identificación de animales infectados con cepas toxigénicas solamente. Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) específicos de PMT diseñados para uso con la bacteria (Bowersock et al., 1992) pueden adaptarse para uso con suero, pero PMT es un inmunógeno débil en cerdos infectados naturalmente y los anticuerpos específicos de PMT a menudo son indetectables. Los primeros métodos empleados para el diagnóstico serológico de la infección por Bb se basaron en la detección de anticuerpos séricos aglutinantes en ensayos que utilizaban formatos de tubo (Jenkins 1978) o de placa (Shashidhar et al., 1983). Se describieron posteriormente algunos ELISA para la detección de anticuerpos en suero (Kono et al., 1994) o las secreciones nasales. A pesar de las ventajas del ELISA, no existen en nuestro medio kits comerciales para la detección de anticuerpos contra Pm toxigénica y/o Bb.

1.5.4. Aislamiento bacteriano

La detección de la infección con Bb se basa típicamente en el aislamiento y las pruebas bioquímicas de colonias sospechosas cultivadas a partir de hisopados nasales o lavados de pulmón post mórtem o muestras de biopsia. Bb crece fácilmente en agar sangre; sin embargo, es deseable el uso de un medio selectivo para prevenir el crecimiento excesivo de otras bacterias comensales y patógenas de crecimiento más rápido y típicamente más numerosas que puedan estar presentes. Pm crece fácilmente en agar sangre. Para la mayoría de las muestras, se prefiere un medio selectivo para evitar el enmascaramiento de las colonias por el crecimiento excesivo de otras bacterias, a menudo presentes en mayor cantidad. Una vez aisladas, las pruebas bioquímicas convencionales pueden usarse para identificar colonias sospechosas.

1.5.5. Diagnóstico molecular

Las cepas causantes de RAP corresponden a Pm toxigénica tipo D o A. Es de utilidad epidemiológica la determinación de los tipos capsulares de Pm toxigénica. Por otro lado, Pm presenta 16 serotipos somáticos siendo los serotipos 3 y 5 son los que se detectan en la mayoría de los aislamientos a partir de muestras clínicas de cerdos. Si bien la Pm es un microorganismo relativamente fácil de aislar a partir de cualquier muestra clínica y los biotipos pueden ser determinados mediante pruebas bioquímicas, otras técnicas más rápidas y específicas como la PCR son útiles no solo para la confirmación diagnóstica sino también para la correcta tipificación de la bacteria, ya sea para saber si es toxigénica o no toxigénica (Nagai et al., 1994) o determinar los biotipos capsulares (Townsend et al., 2001). Respecto a Bb, la identificación de genes que codifican para flagelos puede utilizarse para la detección del agente mediante PCR (Hozbor et al., 1999).

1.5.6. Monitoreo en frigorífico

La prevalencia y la gravedad de la atrofia de los cornetes se estiman mejor mediante el examen de los mismos durante los controles regulares de frigorífico, aunque pueden no detectar enfermedades subclínicas o enfermedades que afectan a cerdos jóvenes que cicatrizan (Register et al., 2000). Para evaluar la atrofia de los cornetes, los hocicos se deben seccionar transversalmente al nivel del primer/segundo premolar superior. La atrofia puede puntuarse

subjetivamente por varios sistemas. Estos métodos se basan en la evaluación subjetiva y visual de las estructuras. Puede haber una considerable variación inter observador dentro de un sistema, por ello, las comparaciones deben ser realizadas por el mismo observador experimentado usando el mismo sistema de puntuación. Igualmente la puntuación subjetiva es muy útil para controlar el estado de la pira y evaluar el tratamiento. La estimación de la prevalencia de la RAP no necesariamente refleja el nivel de la enfermedad clínica, ya que puede ocurrir en piras sin enfermedad clínica evidente o lo que se denomina de presentación subclínica (Parada et al., 2010).

1. 6. Control de la RA

Hay condiciones que agravan la RA, como por ejemplo, alta tasa de reposición, elevada densidad de cerdos, toma de calostro incorrecta de los lechones, control ambiental insuficiente (renovación del aire, concentraciones de oxígeno, niveles de gases, variaciones de temperatura de confort, humedad relativa), mezcla de animales de diferentes edades y/o orígenes, prácticas de bioseguridad deficientes, presentación del pienso en harina con elevado porcentaje de finos y polvo, entre otras cosas (Brockmeier et al., 2012; Register et al., 2012). Por ello el control efectivo de RA requiere una combinación seleccionada de procedimientos de manejo, ambientales, quimioterapéuticos y de vacunación. La protección de los lechones, ya sea mediante tratamiento antibiótico, anticuerpos pasivos mediante la vacunación de las cerdas, o una combinación de ambos, durante las primeras semanas de vida parece ser un factor importante en el control de la rinitis atrófica (Pejsak et al., 1994).

1.7. Tratamiento antibiótico

Los tratamientos antimicrobianos pueden realizarse estratégicamente según el caso y el objetivo del mismo. El uso de antibióticos para reducir la prevalencia y la gravedad de la infección nasal adquirida y controlar los casos de RA incluye la administración por vía de alimentación o parenteral a cerdas y lechones alrededor del momento del parto/destete en un esfuerzo por limitar el grado de colonización en cerdos jóvenes. Resulta conveniente medicar en la alimentación a la cerda en el último mes de gestación y lechones lactantes mediante inyecciones estratégicas de agentes antibacterianos en dosis terapéuticas durante las primeras 3-4 semanas de vida (Register et al., 2012). Los agentes Bb y Pm son susceptibles a la

clortetraciclina, oxitetraciclina y enrofloxacin (Kadlec et al., 2004).

1.8. Vacunación

Las vacunas comerciales actuales típicamente contienen bacterina de Bb y un toxoide de Pm para una protección óptima contra RAP. Los lechones suelen infectarse naturalmente con Bb con mayor frecuencia en las primeras semanas de vida, por lo que la vacunación de cerdas entre 4 y 8 semanas y nuevamente entre 2 y 4 semanas antes del parto proporcionar protección materno-calostroal a los lechones a una edad temprana y así prevenir la infección de los lechones (Foged et al., 1989). La vacunación no previene la colonización pero limita o incluso suprime significativamente la enfermedad clínica disminuyendo la severidad de la enfermedad y aumentar el rendimiento de los lechones (Riising et al. 2002). La mayoría de los estudios de vacunas han examinado la eficacia en términos de prevención de la RA, pero como Bb predispone a la infección con otros patógenos respiratorios, la vacunación o la eliminación de un rebaño pueden tener efectos más amplios en la salud respiratoria.

1.9. Medidas de manejo

Además de las medidas ya mencionadas, para controlar o eliminar el RAP de una piara se incluyen combinaciones de medidas de manejo como la preferencia por sistemas todo adentro- todo afuera, reducir la densidad de población, separación de cerdos con barreras sólidas entre diferentes grupos de edad. Implementar estrictas medidas de higiene. Se deben mantener las tasas de ventilación con un flujo de aire adecuados en la sala, para reducir las bacterias en el aire, el amoníaco y el polvo. Evitar de igual manera las variaciones de temperatura, el enfriamiento y las corrientes de aire inapropiadas. Una vez que la carga de patógenos o la prevalencia baja, muchos factores pueden influir en el equilibrio entre el huésped y el patógeno, por ello la bioseguridad es primordial para mantener a los cerdos sanos. Los estrictos controles de higiene y desinfección sobre los vehículos, el equipo y el personal que ingresa a la granja ayudarán a reducir la reintroducción de los patógenos y minimizar la transmisión entre los rebaños.

1.10. Importancia económica de la RA

La RA puede llevar a una ganancia diaria de peso reducida, una condición corporal deficiente y un crecimiento variable, debido a la dificultad para comer. También puede aumentar el riesgo de infección por enfermedades respiratorias. Varios estudios han informado asociación entre RA y la tasa de crecimiento retardada en algunos rebaños (Pedersen y Barfod 1981). Donkó et al., 2005 propusieron una escala para cuantificar la lesión nasal y luego, en base a ello, calcular los efectos deleteros de la RA, detectando diferencias significativas de rendimiento de crecimiento entre los grupos de cerdos con diversos grados de RA y la ganancia diaria de peso (GDP).

2. HIPÓTESIS

El monitoreo clínico, anatomopatológico, bacteriológico y molecular permite determinar el momento de mayor impacto de la rinitis atrófica en cerdos desde la recría hasta la terminación.

2.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar un monitoreo clínico, anatomopatológico, bacteriológico y molecular en cerdos de un sistema confinado desde la recría hasta la terminación para determinar el momento de mayor impacto de la rinitis atrófica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Determinar la dinámica clinimétrica compatible con rinitis atrófica mediante la observación y cuantificación de estornudos y secreciones nasales en cerdos desde la recría a la terminación.

2- Determinar la presencia de *P. multocida* toxigénica y *B. bronchyseptica* por medio de bacteriología y PCR en cerdos desde la recría a la terminación.

3- Identificar lesiones anatomopatológicas compatibles con rinitis atrófica en cerdos de recría-desarrollo y en frigorífico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. La granja: breve descripción de las instalaciones y el plan sanitario

El estudio se realizó durante el mes de noviembre del 2017 en la granja porcina “Yanquetruz” ubicada en la zona rural de Juan Llerena, provincia de San Luis, sobre la ruta provincial 2 km 51. Se trata de un sistema confinamiento de ciclo completo, *farrow-to-finish* de 2900 madres y alrededor de 29.000 cerdos en engorde. Está conformada por dos sitios, los cuales se encuentran perimetrados con alambrado (Figura 1).

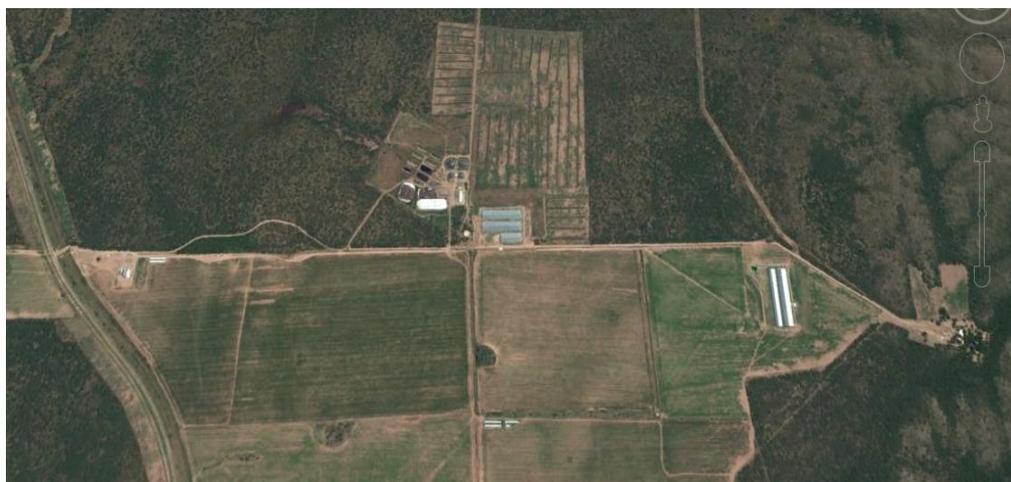


Figura 1. Vista aérea de la granja en donde se realizó el estudio.

El Sitio 1, tiene tres galpones. Dos galpones de gestación, los cuales cuentan con cinco filas de jaulas individuales donde las cerdas permanecen desde que son inseminadas hasta 2-3 días previos al parto. Además de las jaulas, cada galpón cuenta con un anexo. El galpón de Gestación 1, cuenta con 8 corrales para el alojamiento de cerdas en casos excepcionales. En el segundo galpón de gestación, el anexo es otro sector completamente separado de la zona de las jaulas, denominado estímulo. En este sector se encuentran corrales para las cachorras seleccionadas para la reposicion, corrales para sacar celo, padrilleras, zona de recolección del semen, y laboratorio para su evaluación y procesamiento. No todo el semen es propio sino que también se recibe semen de centros de inseminación. El tercer galpón es la maternidad, que cuenta con 8 salas, cada una con 64 jaulas de maternidad. Y 4 salas para las cerdas retenidas para reposicion interna. En las salas de maternidad se cuenta

con piso slat de plástico en las jaulas, y pasillos de cemento, también con control automatizado de las variables ambientales, por medio del sistema Chore-Tronics que permite adaptar y registrar de las temperaturas y controlar la ventilación en cada sala. Este galpón cuenta con otro sector llamado aclimatación, donde hay 4 salas extras donde quedan las hembras para la selección de la futura reposición interna. El paso de cerdas de galpón a galpón se realiza por medio de pasillos de concreto con paredes por lo cual no tienen contacto con el exterior.

La cuota de servicio semanal es de 142 servicios. Las cerdas son ingresadas a la sala unos días previos al parto, la cual está limpia, desinfectada y seca con un día de anterioridad a recibir a las cerdas. Existe personal destinado exclusivamente a esta tarea.

Semanalmente se destetan dos salas, a los 21 días de edad promedio. Los lechones destetados son trasladados en un camión al sitio 2, ubicado a más de 400 metros. La sala que los recibe los espera limpia, seca y desinfectada, con un día de vacío. Cada sala tiene una capacidad de 1400 animales aproximadamente, tiene 2 filas de 12 corrales separados por un pasillo central. En el ingreso a la sala se cuenta con pediluvio.

El sitio 2, tiene 22 salas en total, los lechones destetados ingresan a su correspondiente sala y permanecen allí hasta llegar al peso de faena alrededor de los 118 kilos en promedio. No se realiza homogenización ni ingreso de animales de diferentes edades a las salas. Estas salas tienen piso slat de concreto dentro de los corrales.

Los animales terminados son cargados con destino a abastecer el frigorífico Alimentos Magros S.A, ubicado en Justiniano Posse, provincia de Córdoba, en el cual se realizó el monitoreo anatomopatológico.

En cuanto a las condiciones sanitarias de la granja, la misma se encuentra libre de Aujeszky, Brucelosis, Influenza y pleuropneumonia contagiosa porcina. En la misma se había diagnosticado neumonía enzoótica porcina y Circovirus porcino tipo 2. En la Tabla 1 se muestra el esquema de tratamiento/vacunación de los cerdos (animales de línea de producción), en las Tablas 2, 3 y 4 los esquemas de vacunación de las cachorras de reemplazo, hembras de primer parto y hembras de segundo parto, respectivamente.

La granja contaba con antecedentes de lesiones compatibles con RA observadas en frigorífico. Por lo que se estaba analizando la incorporación al plan sanitario de rutina la vacuna contra RA. El presente trabajo surge como un monitoreo previo a la incorporación de la vacuna para lograr determinar el impacto de la RA en el establecimiento.

Días de vida	Droga- Vacuna
3	Hierro inyectable Toltrazuril
21	Circovirus porcino 2(vacuna) Certiofur LA
38	Clortetraciclina
40	Tiamulina Soluble
50	Florfenicol alimento
52	Amoxicilina Soluble
130	Tilmicosina

Tabla 1. Esquema de tratamiento/vacunación de los animales de la línea de producción.

Días de vida	Vacuna
60	Mycoplasma hyopneumoniae
160	Parvovirus- Leptospirosis Circovirus Porcino tipo 2 Mycoplasma hyopneumoniae
180	Parvovirus- Leptospirosis Mycoplasma hyopneumoniae

Tabla 2. Esquema de vacunación de cachorras de reemplazo.

Días pre-parto	Vacuna
35	Colibacilosis- Clostridial Mycoplasma hyopneumoniae
15	Colibacilosis- clostridial
Días pre-servicio	Vacuna
15	Parvovirus- Leptospirosis

Tabla 3. Esquema de vacunación de hembras de primer parto

Días pre-parto	Vacuna
35	Mycoplasma hyopneumoniae
15	Colibacilosis- Clostridial
Días pre-servicio	Vacuna
15	Parvovirus- Leptospirosis

Tabla 4. Esquema de vacunación de hembras de segundo parto.

El tratamiento antibiótico que se implementaba en el momento del monitoreo era el siguiente:

ALIMENTO	ANTIBIOTICO	PreMix	Agua	Dosis/ tn	Días al inicio	Días de administración
NO	CEFTIOFUR	inyectable			18 días	----
F1	Sulfato de colistina	X		0.16/tn	21 ds(3S)	5-7 ds(4S)
F2	Sulfato de colistina	X		0.4/tn	30 ds(4S)	7-9 ds(5S)
INICIADOR	Clortetraciclina	X		22mg/kg	38 ds(5S)	10 ds(6S)
	Tiamulina		X	10mg/kg	40 ds(5S)	7 ds(6S)
RECRIA	Florfenicol	X		10 mg/kg	50 ds(7S)	5 ds(7S)
	Amoxicilina		X	20mg/kg	52 ds(7S)	7 ds(8S)
DESAR. 1						
DESAR. 2						
ENGORDE 1						
ENGORDE 2	Tilmicosina	X		10mg/kg	130 ds	10 ds

3.2. Monitoreo clínico

Se llevó a cabo la aplicación del protocolo clinimétrico respiratorio para la cuantificación de signos clínicos del tracto respiratorio superior propuesto por Camacho (2016). Se realizaron dos monitoreos, con un intervalo entre ellos de 7 días. El día previo a la realización del monitoreo clinimétrico se llevó a cabo una capacitación por medio de un experto al tesista. Al día siguiente, el tesista realizó el monitoreo en el sitio II, desde los corrales donde estaban alojados los lechones de 4 semanas de edad hasta las 20 semanas de edad. Se midió la proporción de estornudos y de secreciones nasales y oculares de tipo seroso, mucopurulento y hemorrágico de la siguiente manera:

1.- Ingreso a la nave, selección de sala correspondiente, ingreso a corral elegido al azar. Conteo del n° de animales con los que contaba el corral seleccionado.

2.- Estímulo: Se movió a los animales de cada corral de manera constante durante 30 segundos (cronometrados), mediante el ingreso al corral y estimulación por medio de aplausos y silbidos.

3.- Registro: Después de concluidos los 30 segundos, se procedió a contar y anotar en la planilla correspondiente del n° de animales con estornudos, durante 3 minutos medidos por cronómetro. Luego de estos 3 minutos se registró el número de animales con secreciones nasales y oculares, según el tipo.

Todos los datos obtenidos fueron registrados en la planilla que se detalla en el **Anexo N° 1**.

3.3. Monitoreo anatomopatológico

3.3.1. Monitoreo en recría (Sitio II)

Para la observación de lesiones anatomopatológicas compatibles con RA en cerdos de recría se trabajó del siguiente modo: Se inspeccionó los hocicos de los animales muertos recientes de 4 a 16 semanas de edad, durante un periodo de dos semanas, día por medio. En un primer momento se había planteado un rango menor, pero por los resultados obtenidos en la clinimetría se decidió ampliar el rango. La inspección se realizó cortando transversalmente el hocico del cerdo a nivel del 1°-2° premolar superior. De cada hocico cortado se tomó una foto digital para su posterior análisis y se graduaron las lesiones *in situ*. El análisis posterior de las fotos se realizó a ciegas, por parte de la tesista y por personal del laboratorio HIPRA.

3.3.2. Monitoreo en frigorífico

El jueves 30 de noviembre del 2017 se llevó a cabo el monitoreo en frigorífico, en este caso, inmediatamente posterior a la faena del animal se procede a la separación de 43 cabezas, a las cuales se les realizó la inspección de los hocicos mediante corte transversal del mismo, a nivel del 1°-2° premolar superior. De cada hocico cortado se tomó una foto digital para su posterior análisis y se graduaron las lesiones *in situ*. De igual manera a lo realizado con los cerdos de recría, el análisis posterior de las fotos se realizó a ciegas, por parte de la tesista y por personal del laboratorio HIPRA. Tanto para la graduación de la RA *in situ*, como para el análisis de las fotografías de cerdos de recría y frigorífico, se utilizó la misma escala: El grado de atrofia de los dos cornetes nasales ventrales (derecho e izquierdo) y de los dos cornetes nasales dorsales (derecho e izquierdo) se puntuaron utilizando la escala propuesta por Magyar et al. 2002 (Figura 2)

A. Atrofia de las volutas de los cornetes:

- 0 No atrofia.
- 1 Atrofia ligera (falta menos de la mitad de la voluta).
- 2 Atrofia moderada (falta más de la mitad de la voluta).
- 3 Atrofia grave (el hueso de la voluta es recto).
- 4 Atrofia muy grave (desaparición completa de la voluta)

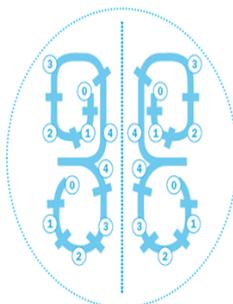
B. La desviación del septo nasal:

- 0 No existe desviación.
- 1 Desviación muy ligera.
- 2 Desviación del septo

Atrofia de las volutas del cornete nasal ventral
(0-4 para cada voluta)
x 4 volutas

Puntuación máxima: 16 puntos

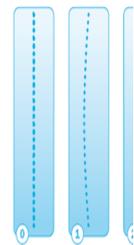
Máximo 16	
0	Sin atrofia
1	Atrofia leve (falta menos de la mitad de la voluta)
2	Atrofia moderada (falta más de la mitad de la voluta)
3	Atrofia grave (el hueso de la voluta es recto)
4	Atrofia muy grave (desaparición completa o casi completa de la voluta)



Desviación del septo
(0-2)

Puntuación máxima: 2 puntos

Máximo 2	
0	No existe desviación
1	Desviación muy ligera
2	Desviación del septo



Puntuación máxima total: 18 puntos

Figura 2. Esquema de puntuación propuesto por Magyar et al., 2002.

El grado de lesión, según la puntuación obtenida, se realizó de la siguiente manera:

Grado 1: puntuación total de 0-4 (cornetes sanos o con una muy ligera lesión)

Grado 2: puntuación total de 5-8 (cornetes con lesión ligera a moderada)

Grado 3: puntuación total de 9-18 (cornetes con una lesión de moderada a muy severa)

3.4. Toma de muestras

Para la detección de Pm toxigénica y Bb se trabajó con dos tipos de muestras distintas: Hisopados nasales y fluidos orales.

3.4.1. Toma de muestra de Fluidos Orales

Se utilizó el pack para la toma de muestra de fluido oral CIVTEST SUIS ORAL FLUIDS del laboratorio HIPRA SUIS, el cual cuenta con los siguientes materiales: cuerda de algodón 100% (no tratada con productos químicos) con soga para adaptarla al corral, bolsas de plástico (tipo Zipplog®), tubos de plástico estériles con base cónica o redondeada y con capacidad suficiente para el volumen de la muestra (20cc) y guantes de látex (Figura 3). Otros elementos necesarios fueron cronómetro, tijera, conservadora, refrigerantes, cinta adhesiva y lapicera para identificación.



Figura 3: Pack para la toma de muestra de fluidos orales (CIVTEST SUIS ORAL FLUIDS)

Se tomaron muestras de fluidos orales de 3 corrales de cada categoría a evaluar (6, 10, 14 y 18 semanas de edad). Se eligió los 3 corrales de cada sala al azar. Se colgó la soga del techo del corral, hasta la altura de los hombros de los cerdos y fue ubicada en el centro

del corral, logrando de esta forma que los cerdos tengan acceso a la misma desde todos los lados (Figura 4 y 5).



Figura 4 : Fotografía del procedimiento de la toma de muestra de fluido oral.



Figura 5: Fotografía del procedimiento de la toma de muestra de fluido oral.

Se cronometraron 30 minutos en los que los cerdos mordían la sogá. Finalizado el tiempo, con guantes se procedió a colocar el extremo de la sogá dentro de la bolsa de plástico y se escurrió. Recolectando así el fluido en la bolsa, cuando se obtuvo un volumen

igual o superior a 10 ml, se lo traspasó al tubo de plástico estéril con tapa a rosca con base cónica. Se identificó cada tubo con número de muestra, número de corral y categoría. Y se lo colocó en una caja de telgopor con refrigerantes hasta que llegaron las muestras a la UNRC.

3.4.2. Toma de muestra de hisopados nasales

Se tomaron muestra de hisopados nasales (Deltalab, España) de animales de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 semanas de edad, 9 hisopados de cada categoría (n necesario para la detección de al menos un positivo, con una prevalencia estimada del 30% con un 95% de confianza –WinEpicope-). Se procedió a la recolección de la muestra entre dos operarios. Uno realizó sujeción y la tesista la extracción de la muestra evitando no tocar ninguna parte del hocico antes de ingresar a la fosa nasal, y una vez ingresado al hisopo se realizaron vueltas en sentido horarias, y se lo colocó en su medio correspondiente.

3.5. Procesamiento de muestras

3.5.1. Fluidos orales

Una vez en el laboratorio, una alícuota de 1 ml del mismo fue colocado en tarjetas FTA para su envío al laboratorio HIPRA suis (Figura 6), en donde serían procesadas para la detección de Pm toxigénica y Bb por medio de una PCR semicuantitativa.

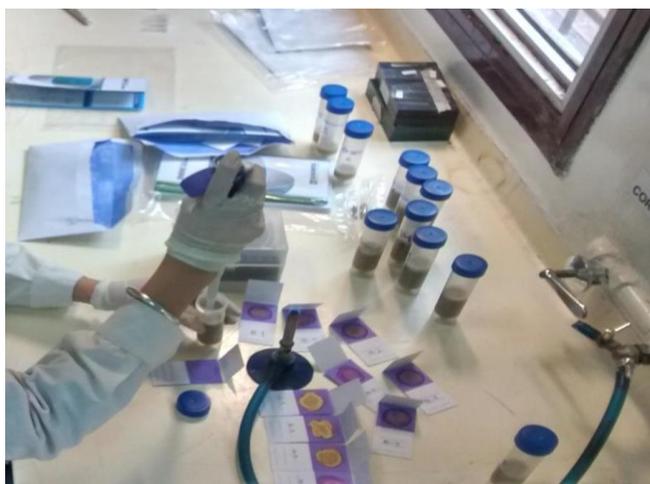


Figura 6: Preparación de tarjetas FTA para el envío al laboratorio HIPRA SUIS

3.5.2. Hisopados nasales

Los hisopados nasales (n total=72) se procesaron por bacteriología en el Laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Cada hisopado se sembró en agar sangre al 5% de sangre ovina. Se incubó la placa en estufa a 37°C por 24 hs. Luego se realizó tinción de Gram para determinar morfología y composición de la pared celular. Se tomaron las colonias para realizar las pruebas bioquímicas correspondientes, entre ellas se evaluó la producción de indol, movilidad y producción de sulfhídrico (S.I.M). Las colonias compatibles con Bb se confirmaron por la PCR descrita por Hozbor et al. 1999.

4. RESULTADOS

4.1. Monitoreo clínico

El porcentaje de estornudos, secreciones nasales y oculares serosas tuvieron un comportamiento similar, aumentando a partir de las 4-6 semanas (Gráficos 1 y 2).

En el MONITOREO 1 la presencia de estornudos comenzó a aumentar a las 7 -8 semanas (6%), alcanzando el máximo a las 9 semanas (18%), para luego disminuir a las 10 semanas (5%), a las 12 (4%), y luego mostrar valores que no superaban el 3%, a las semanas 13, 14, 16, 17 y 18 (Gráfico 1).

En el MONITOREO 2, la presencia de estornudos se observó desde la semana 7 (5,5%), 9 (11%), 10 (5%), 11 (9%) y 12 (4%). En los animales más grandes, el porcentaje de estornudos no superó el 2% a las semanas 14, 16 y 17, el resto de las edades (13,15, 18, 19, 20, 21 y 22) no presentaron estornudos (Gráfico 2).

En ambos monitoreos se observó la presencia de estornudos en un rango amplio de edad (semana 4 a semana 18) pero no superaban el 3%, a excepción de los picos que se encontraron concentrados entre la semanas 7 y 12. Los valores mayores fueron en el monitoreo 1 a la edad de 9 semanas con 18% y en el monitoreo 2 a la edad de 9 semanas son un 11% (Gráficos 1 y 2).

No se observaron secreciones nasales de tipo mucosas, mucopurulentas o hemorrágicas. Sólo se observaron secreciones serosas nasales (SNS) y secreción ocular serosa (SOS).

La SNS en el monitoreo 1 se comienza a observar en la semana 5 con 8%, y desde allí continua aumentando el porcentaje de animales afectados hasta un pico de 53% en la semana 10, tiende a disminuir llegando a un 38% en la semana 12, y vuelve a hacer un pico de 57% en la semana 16. Luego la tendencia es decreciente hasta llegar a un valor de 37% en las 22 semanas de vida. Por otro lado, la SOS comenzó a observarse a partir de la semana 7 con un 6%, hace un pico a la semana 10 con un 32% y otro pico a semana 13 de un 39%, luego aumenta hasta llegar al valor máximo de 45% en la semana 13, después de esta edad se mantiene en ese rango hasta la semana 22 (29%). Gráfico 1.

La SNS en el monitoreo 2 aparece a la semana 4 de edad, con un 7% y desde allí va en aumento hasta llegar al 51% en la semana 11, luego comienza a disminuir hasta llegar a 21% a la semana 16. Luego las secreciones vuelven a aumentar, llegan a un 39% en la semana 19, y continúa en esos valores hasta la edad de faena. La SOS comienza en la

semana 6, y va en aumento hasta llegar al pico de 53% en la semana 13. Después comienza a disminuir hasta llegar a la semana 15 con 27%, después de aquí se mantiene en valores menores de 42% y mayores de 27% hasta la edad de faena.

La tendencia de las secreciones es similar entre ellas. Aparecen a temprana edad antes o junto con los estornudos y tienden a aumentar a medida que avanza la edad del animal. Sus picos ocurren entre 1 a 2 semanas posterior al pico de estornudos y luego de alcanzarlo, a diferencia de los estos que disminuyen, las secreciones tienden a mantenerse en valores altos. En la semana 1, nunca disminuyen por debajo del 29% para SOS y 37% para SNS y en la segunda semana no disminuyen menos que 21% para SNS y 27% para SOS.

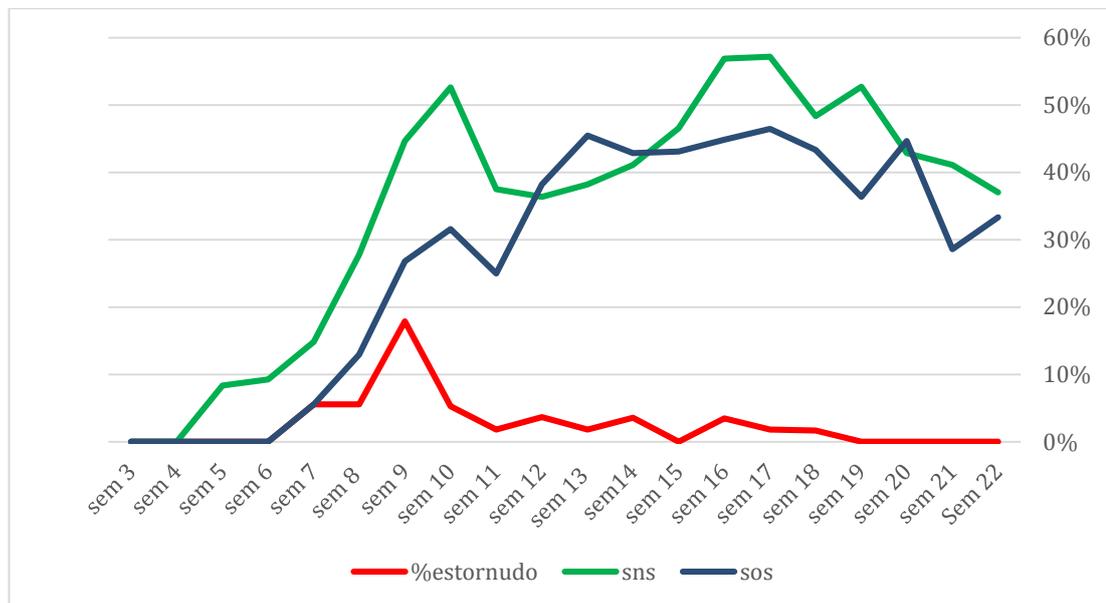


Gráfico 1: Porcentaje (%) de animales con estornudo, secreción nasal serosa (SNS) y secreción ocular serosa (SOS) de la semana 1.

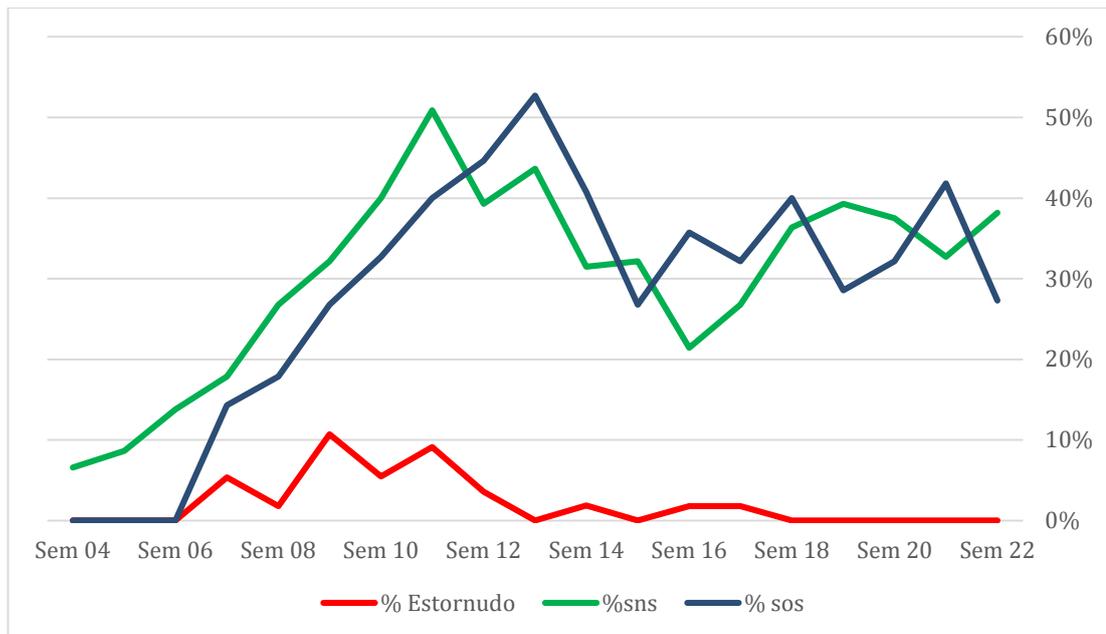


Gráfico 2: Porcentaje (%) de animales con estornudo, secreción nasal serosa (SNS) y secreción ocular serosa (SOS) de la semana 2.

4.2. Monitoreo anatomopatológico

En el monitoreo de lesiones anatomopatológico en recría al igual que en frigorífico se observó diferencia entre los resultados obtenidos por la tesista que puntuó *in situ* y el laboratorio por medio de las imágenes digitales. A pesar de esta diferencia la tendencia es similar en los dos casos, ya que en la recría la mayoría de los animales presentaron grado 1 de lesión (un 82% y 77%), seguido por grado 2 (un 14% y 18%) y solo un pequeño porcentaje presentó lesiones de grado 3 (4 % y 5%) (Gráfico 3).

En frigorífico el resultado del monitoreo concluyó que también la mayoría de los animales presentaron un grado 1 de lesión (un 72% y 91%), seguido por grado 2 (un 26% y 9%) y sólo un pequeño porcentaje presentó lesiones de grado 3 (4 % y 5%).

La tesista observó un 2% de lesiones grado 3, mientras que la empresa no informó lesiones de grado tipo 3. En el **Anexo N° 2** se encuentran las fotos digitales de los cortes de hocico con su correspondiente puntuación y graduación según la categoría evaluada.

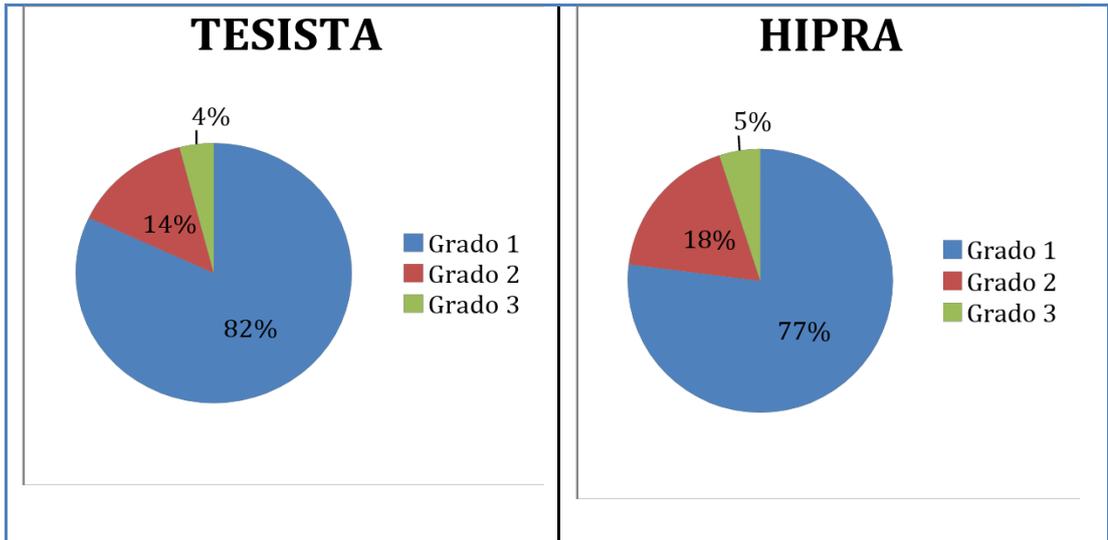


Gráfico 3. Porcentajes de los diferentes grados de lesiones obtenidos en el monitoreo en Recria según tesista y según el laboratorio HIPRA SUIS.

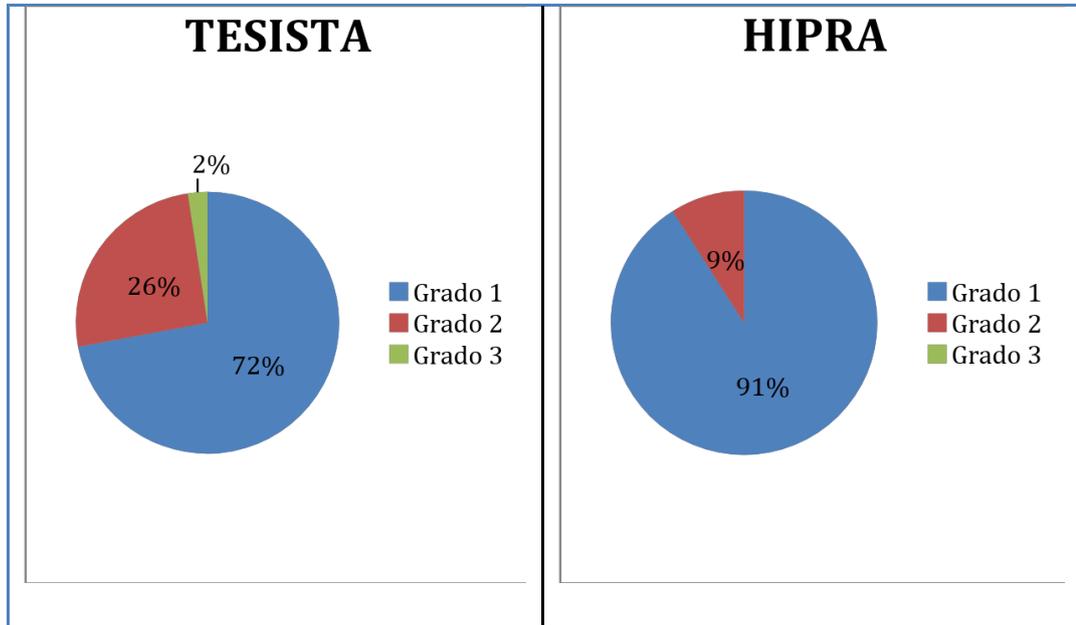


Gráfico 4. Porcentajes de los diferentes grados de lesiones obtenidos en el monitoreo en frigorífico según tesista y según el laboratorio HIPRA SUIS.

4.3. Bacteriología

Del procesamiento de los 72 hisopados nasales, se aisló Bb en 3 muestras, y en ninguna se logró aislar Pm. Se aisló Bb en el 11% de los animales de 6 semanas de edad y 22% de animales de 8 semanas de edad. De acuerdo al esquema de muestreo empleado puede afirmarse que en animales de 6 y 8 semanas de edad la prevalencia de Bb es mayor al 30%.

4.4. Diagnóstico molecular

Pm toxigénica fue detectada por PCR semicuantitativa en una muestra de fluido oral de las 14 semanas de edad (Tabla 5), mientras que Bb fue detectada a partir de las 10 semanas de edad en todas las muestras de fluidos orales (Tabla 6).

MUESTRA	EDAD	RESULTADO
Fluido Oral 1	6 semanas	NEG
Fluido Oral 2	6 semanas	NEG
Fluido Oral 3	6 semanas	NEG
Fluido Oral 4	10 semanas	NEG
Fluido Oral 5	10 semanas	NEG
Fluido Oral 6	10 semanas	NEG
Fluido Oral 7	14 semanas	POS +
Fluido Oral 8	14 semanas	NEG
Fluido Oral 9	14 semanas	NEG
Fluido Oral 10	18 semanas	NEG
Fluido Oral 11	18 semanas	NEG
Fluido Oral 12	18 semanas	NEG

Tabla 5. Resultados obtenidos por PCR para la detección de la Toxina de Pm. NEG: No se ha detectado ADN bacteriano. POS (+): Se ha detectado ADN bacteriano en baja cantidad. POS (++): Se ha detectado ADN bacteriano en moderada cantidad **POS (+++):** Se ha detectado ADN bacteriano en alta cantidad.

MUESTRA	EDAD	RESULTADO
Fluido Oral 1	6 semanas	NEG
Fluido Oral 2	6 semanas	NEG
Fluido Oral 3	6 semanas	NEG
Fluido Oral 4	10 semanas	POS ++
Fluido Oral 5	10 semanas	POS +++
Fluido Oral 6	10 semanas	POS ++
Fluido Oral 7	14 semanas	POS ++
Fluido Oral 8	14 semanas	POS ++
Fluido Oral 9	14 semanas	POS ++
Fluido Oral 10	18 semanas	POS ++
Fluido Oral 11	18 semanas	POS ++
Fluido Oral 12	18 semanas	POS ++

Tabla 6. Resultados obtenidos por PCR para la detección de Bb. NEG: No se ha detectado ADN bacteriano. POS (+): Se ha detectado ADN bacteriano en baja cantidad. POS (++): Se ha detectado ADN bacteriano en moderada cantidad. **POS (+++):** Se ha detectado ADN bacteriano en alta cantidad.

5. DISCUSIÓN

Si bien el estornudo, signo clínico característico de la RA está presente, se sabe que no es exclusivo de esta enfermedad ya que puede ser producido por otras etiologías infecciosas y no infecciosas. En el presente estudio, puede descartarse enfermedad de Aujeszky e influenza ya que la granja era libre. No se evaluó la presencia de Citomegalovirus, pero al encontrarse lesiones atróficas podría descartarse, ya que virus no la produce. Otro factor importante, que no debe excluirse en los sistemas confinados, es el amoniaco, ya que el mismo puede producir irritación de la mucosa, producir estornudos y secreciones, y predisponer a la infección por bacterias productoras de RA (Urbain et al., 1994). Lamentablemente los niveles del gas no fueron investigados en este estudio.

De acuerdo al esquema de muestreo empleado puede afirmarse que en animales de 6 y 8 semanas de edad la prevalencia de Bb es mayor al 30%. Respecto a este hallazgo, Bb es altamente prevalente entre los cerdos y con frecuencia se aísla tanto de cerdos con neumonía o RA como de aquellos aparentemente. No se aislaron colonias compatibles con Pm en ninguno de las muestras, sin embargo fue detectada por PCR semicuantitativa a las 10 semanas de edad, por lo cual sería posible que la prevalencia en las categorías muestreadas fuera menor al 30%.

Respecto a la relación entre la presencia de Bb y Pm y la aparición de la signología clínica, Bb se detectó una semana antes a la aparición de estornudos, por lo cual podría considerarse que la bacteriología tenga algún valor en la detección preclínica de la RA como ha sido informado previamente (Parada et al., 2010). Esto podría deberse a la forma de transmisión que, si bien puede darse de forma horizontal, por contacto o principalmente por gotitas de aerosol entre lechones sobre todo durante el destete, su principal forma de transmisión es vertical a través de madres portadoras a sus lechones durante la lactancia (Register et al., 2012; Brockmeier et al., 2012). En este último caso, los lechones cuentan con inmunidad calostrual y los anticuerpos adquiridos pasivamente por el calostro de cerdas infectadas protegen contra las lesiones de los cornetes pero no contra la infección (Riising et al., 2002). Esto hace que los lechones no presenten la RA hasta que decaiga dicha inmunidad, entre las 3 y 6 semanas de vida. Esto coincide con los resultados obtenidos aquí, en donde Bb se aisló a las 6 semanas de edad y a las 7 semanas comienzan a observarse picos en el porcentaje de estornudos.

Además de la epidemiología natural de la RA, no puede obviarse el tratamiento

antibiótico, dado que aparentemente influyó en la dinámica de los signos clínicos. A las 5 semanas de vida comenzaba el tratamiento con clortetraciclina y tiamulina, durante una semana, luego se continuaba con florfenicol y amoxicilina hasta las 8 semanas de vida. Si bien los signos clínicos (estornudo, SNS y SOS) comienzan durante el tratamiento, alcanzan los máximos picos después de las 8 semanas de vida, una vez suspendido el mismo. Esto sugiere que aunque las bacterias pueden estar presentes en lechones jóvenes, la infección se torna más severa cuando se suspenden los tratamientos antibióticos. Lamentablemente no se realizaron antibiogramas para evaluar los perfiles de sensibilidad de Bb, que podrían haber esclarecido algo más al respecto. Otro aspecto importante respecto al modo de consumos y biodisponibilidad de los antibióticos usados es que, si bien la Clortetraciclina es uno de los antibióticos más recomendados para esta afección (Brockmeier et al., 2012), la dosificación a los cerdos es por alimento, por lo que la dosificación total que cada cerdo recibe depende del consumo, que puede modificarse por múltiples variables. Esto podría redundar en una subdosificación de los antibióticos, reduciendo la performance de los mismos.

El monitoreo molecular de los fluidos orales, demuestra la presencia de ADN bacteriano en moderada cantidad de Bb desde la semana 10 hasta la semana 18 y ADN de la toxina de Pm en poca cantidad a las 14 semanas de edad. El uso de los fluidos orales se ha vuelto popular en los últimos años para la detección de patógenos mediante la PCR. El uso de fluidos orales, en sentido estricto, es cada vez más utilizado para la detección de patógenos porcinos puesto que constituye un método barato, fácil, rápido, no invasivo, que no causa estrés y que permite que gran parte de la población de cerdos de una sala o corral sean muestreados. En este sentido se ha descrito su utilización para la detección directa y/o indirecta de PRRSV, PCV2, *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira* spp, *Salmonella* Spp, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y virus de influenza (Prickett et al., 2008; Costa et al.), sin embargo no se ha encontrado en la literatura información acerca de su uso en la detección de Bb y Pm. Por ello, la información obtenida en este estudio constituye un antecedente importante para la detección de estos agentes en muestras de fluidos orales. Sin embargo, hay que considerar que la detección de ADN de las bacterias en los fluidos, solo significa que las mismas se encuentran en la cavidad oral de los cerdos, sean viables o no.

En el monitoreo de lesiones anatomopatológico en recría al igual que en frigorífico se observó diferencia entre los resultados obtenidos por el técnico que puntuó *in situ* y el laboratorio por medio de las imágenes digitales. Tales diferencias pueden ser debidas en

primer lugar a la variación entre observadores para la detección de signos clínicos es contundente (Baadsgaard y Jørgensen, 2003) y que por más que se utilice la misma escala de graduación es importante la capacitación previa de los observadores en conjunto para definir y categorizar la variable a observar.

En cuanto a los resultados obtenidos en el monitoreo de lesiones en el frigorífico, se observa que hay una disminución respecto a lo observado en recría, en cuanto al porcentaje de lesiones de grado 3 y la mayoría son de grado 1. Dentro de las lesiones grado 1, se incluyen las lesiones que tienen puntaje de atrofia 0 (normal), hasta el 4 (con atrofia). Por lo cual no es un detalle menor aclarar el porcentaje de animales con puntaje 0 dentro del totalidad de la muestra. De las 22 muestras obtenidas, HIPRA consideró con puntaje 0 a 10 muestras (45%), y la tesista 4 (18%). Lo mismo ocurre con las lesiones en frigorífico que de las 43 muestras tomadas²⁵ (58%) tienen puntaje 0 de atrofia para HIPRA y 10 (23%) para la tesista. Más allá de la diferencia en el puntaje, atribuible a las diferencias inter-observador, se refleja un alto porcentaje de animales sin lesión compatible con RA.

Con los datos aportados por la inspección de cornetes nasales en la granja y en el frigorífico, los resultados de la técnica de PCR y bacteriología para Bb y Pm toxigénica, la clinimetría y la observación directa a los animales en el transcurso del ensayo en el cual se pudo construir una anamnesis descartando de la misma la presencia de desviaciones de hocico, braquignatismo o epixtasis, es posible concluir que en el establecimiento se encuentra presente un caso de RA no progresiva leve. Porque existen lesiones atroficas en los animales pero en su mayoría de grado 1 y que más allá de las diferencias inter observador, aquellas de mayor grado tienen a disminuir en la etapa de frigorífico. El aislamiento de Bb confirma la presencia de agente etiológico involucrado, pero no logró aislarse Pm. Los fluidos orales apoyan la teoría de la persistencia de Bb en edades más avanzadas. La disminución de los estornudos acompañan la resolución de las lesiones que se manifiestan en frigorífico. Las secreciones continúan en valores altos, pero las mismas pueden deberse a otros factores antes mencionados como niveles de amoníaco, entre otros.

6. CONCLUSIONES

Utilizando las distintas herramientas diagnósticas se concluyó que el momento de mayor impacto de la RA es en animales desde las 6 a las 13 semanas de vida. Por un lado, utilizando los resultados de los monitoreos clínicos para la cuantificación de estornudos se percibió que la clinimetría fue más dinámica en este rango etario y que a partir de las 13 semanas de edad, comienza un descenso hasta desaparecer a las 18 semanas de vida. En cuanto al monitoreo anatomopatológico en la recría, permitió ubicar en el mismo rango de edades el mayor impacto de las lesiones. Con el monitoreo anatomopatológico en frigorífico, se determinó también que estas lesiones presentadas en ese rango de edades además de no presentarse en edades superiores a 13 semanas de vida tampoco evolucionan más adelante, demostrando así, que la enfermedad no progresa y que tiende a delimitarse en ese rango de edades en recría. Por otro lado, el monitoreo bacteriológico, sumado a los anteriores, permitió llegar al diagnóstico definitivo, necesario para poder diagnosticar RANP, lo que demuestra una prevalencia de 30% o más de infección entre las 6 y 8 semanas, también comprendido dentro del rango de edades sugerido como de mayor impacto.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adams, D. R. 1990. Epithelium lining the rostral portion of the porcine nasal mucosa. *Research in Veterinary Science* Vol. 49 No. 1 pp. 61-65.
- Baadsgaard, N.P., Jørgensen, E. (2003). A Bayesian approach to the accuracy of clinical observations. *Preventive Veterinary Medicine*. 59, 189–206.
- Bowersock, TL, Hooper, T, Pottenger, R: 1992, Use of ELISA to detect toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis in swine. *J Vet Diagn Invest* 4:419–422.
- Brockmeier SL, Lager KM. 2002. Experimental airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Microbiol.* 89:267–275.
- Brockmeier, S., Register, K., Nicholson, L. and Loving, L. 2012. Bordetellosis. In: Zimmermann, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (Eds.), *Diseases of Swine*, tenth ed. Wiley-Blackwell Ames, pp. 670–679.
- Costa G, Oliveira S, Torrison J. 2012. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in oral-fluid samples obtained from experimentally infected pigs. *J Swine Health Prod.* 20(2):78–81.
- De Jong, M. F. y Akkermans, J. P. 1986. Investigation into the pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs. I. Atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* and the meaning of a thermolabile toxin of *P. multocida*. *Vet.Q.* 8, 204-214.
- Donkó T, Kovács M, Magyar T. 2005 Association of growth performance with atrophic rhinitis and pneumonia detected at slaughter in a conventional pig herd in Hungary. *Acta Vet Hung;*53(3):287-98.
- Dyce, K. M., Sack, W. O., Wensing, C. J. G. 1999. *Textbook of Veterinary Anatomy*. 2^o Edition pág. 163-182.
- Elling F, Pedersen KB. 1985. The pathogenesis of persistent turbinate atrophy induced by toxigenic *Pasteurella multocida* in pigs. *Vet Pathol.*22(5):469–474.
- Foged NT, Nielsen JP, Jorsal SE. 1989. Protection against progressive atrophic rhinitis by vaccination with *Pasteurella multocida* toxin purified by monoclonal antibodies. *Vet Rec.*125:7–11.
- Geppetti, P., Patachini, R., Nassini, R., Materazzi, S. 2010. Cough: The Emerging Role of the

- TRPA1 Channel. *Lung* (2010) 188(Suppl 1):S63–S68m DOI 10.1007/s00408-009-9201-3.
- Hansen M. S, Pors S. E, Jensen H. E, Hansen V. B, Bisgaard M, Flachs E. M, Nielsen O. L. 2010. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease 324 complex in Denmark. *J. Comp. Pathol.* 120–131.
- Harvill, ET, PA Cotter, MH Yuk y JF Miller. 1999. Test the function of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella bronchiseptica* by manipulating host immunity. *Infect. Immun.* 67 : 1493-1500.
- Hozbor D, Fouque F, Guiso N. 1999. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol.* 150(5):333-41.
- Jenkins, E. 1978. An agglutination test for the detection of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. *Can J Comp Med* 42: 286-292.
- Kadlec K, Wiegand I, Kehrenberg C, Schwarz S. 2004. Studies on the mechanism of β -lactam resistance in *Bordetella bronchiseptica*. *J Antimicrob Chemother* 59:396–402. doi:10.1093/jac/dk1515.
- Kono Y., Suzuki S., Mukai T., Okazaki K., Honda E., Yamashiro T. 1994. Detection of specific systemic and local IgG and IgA antibodies of pigs after infection with *Bordetella bronchiseptica* by ELISA, *J. Vet. Med. Sci.* 56; 249-253
- Magyar T, Glávits R, Pullinger GD, Lax AJ. 2000. The pathological effect of the bordetella dermonecrotic toxin in mice. *Acta Vet Hung* 48:397–406.
- Magyar T, Lax AJ. 2002. In: *Polymicrobial Diseases*. Brogden KA, Guthmiller JM, editor. Washington (DC, USA): ASM Press. Atrophic rhinitis; pp. 169–197.
- Markowska-Daniel, I., Jabłon'ski, A., Nowak, A., Stepniewska, K., Pejsak, Z. 2009. Elaboration of a PCR test for the detection of *Pasteurella multocida* dermonecrotogenic strains in nasal swabs of pigs. *Journal Medycyna Weterynaryjna* Vol. 65 No. 8 pp. 542-545.
- Munyaka PM, Khafipour E, Ghia JE. 2014. External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. *Front Pediatr.* 2:109.
- Nagai S.; S. Someno; T. Yagihashi. 1994. Differentiation of Toxigenic from Nontoxigenic Isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr 1994 1004-1010.

- Parada, J., Carranza, A., Fantoni, G., Busso, J. J., Milanesio, L., Chanique, A., Pelliza, B., Ambrogi, A. 2010. Sistema de monitoreo de rinitis atrofica en una granja porcina. Memoria del X congreso nacional de producción porcina S20 pp 264. Salta-Argentina
- Pedersen KB, Barfod K. 1981. The aetiological significance of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. *Nord Vet Med* 33:513–522
- Pedersen, K. B., Nielsen, N. C., eds. 1983. Atrophic Rhinitis of Pigs. *Comm Eur Communities Rep EUR 8643 EN*. Luxembourg, p. 205.
- Pedersen, K.B., Elling, F. 1984. The pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs induced by toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Comp Pathol* 94: 203–214, 1984
- Pejsak Z., Wasieńska B., Markowska-Daniel I. & Hogg A. 1994. Field evaluation of thirteen regimens for the control of progressive atrophic rhinitis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 17, 125–132.
- Prickett JR, Kim W, Simer R, et al. 2008 Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *J Swine Health Prod.*16(2):86–91.
- Register KB, DeJong KD. 2006. Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet Microbiol.* 2006 Oct 31;117 (2-4):201-10.
- Register, K., Brockmeier, S., de Jong, M. Pijoan, C. 2012. Pasteurellosis. In: Zimmermann, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (Eds.), *Diseases of Swine*, tenth ed. Wiley-Blackwell Ames, pp. 798–810.
- Riising HJ, van Empel P, Witvliet M. 2002. Protection of piglets against atrophic rhinitis by vaccinating the sow with a vaccine against *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Rec.* 150:569–571
- Schokker D, Zhang J, Vastenhouw SA, Heilig HG, Smidt H, Rebel JMJ, 2015. Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs. *PloS One.* 2015;10, e0116523.
- Shashidhar BY, Underdahl NR, Socha TE. 1983. Serologic survey for *Bordetella bronchiseptica* in Nebraska specific-pathogen-free pigs. *Am J Vet Res.* 44:1123–1125.
- Sørensen, V., Jorsal, S. E., Mousing, J. 2006. Diseases of the respiratory system. In: Straw, B. Zimmermann, W. D’Allaire, S. Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. 9th ed.

Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 149–177.

- Townsend K. M.; J.D. Boyce; J.Y.Chung; A.J. Frost; B. Adler. 2001. Genetic Organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and Development of a Multiplex Capsular PCR Typing System. *Journal of Clinical Microbiology* Mar 2001 p: 924-929.
- Urbain, B., Gustin, P., Prouvost, J.F., Ansay, M. 1994. Quantitative assessment of aerial ammonia toxicity to the nasal mucosa by use of the nasal lavage method in pigs. *American Journal of Veterinary Research* Vol. 55 No. 9 pp. 1335-1340.
- Van Alstine, (2012). Respiratory System. *Diseases of Swine 10 TH Edition* pp 348-362.
- Yoon, K. J., Edington, N. 2006. Porcine cytomegalovirus. In BE Straw, J Zimmerman, S D'Allaire, DJ Taylor, eds. *Diseases of Swine*, 9th ed. Ames, IA: Blackwell Publishing Company, pp. 323–329.

8. ANEXOS

Anexo N°1

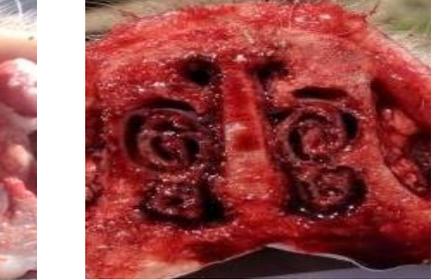
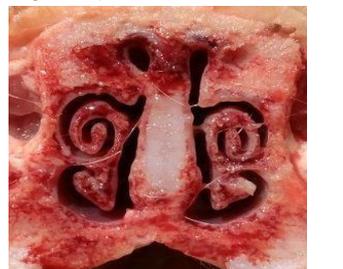
Planilla utilizada para el registro de estornudos, y secreciones durante el monitoreo clinimétrico.

Planilla de clinimetría. Semana de monitoreo N°:										
Establecimiento:	Fecha:									
Signos Clínicos	Sala N° 1	Sala N° 2	Sala N° 3	Sala N° 4	Sala N° 5	Sala N° 6	Sala N° 7	Sala N° 8	Sala N° 9	Sala N° 10
N° A. de estornudo	N°									
N° A. de tos										
Eventos de tos										
Secrecion nasal										
Serosa										
Mucosa										
Muco-purulenta										
Secrecion ocular										
Serosa										
Mucosa										
Sala N° 11	Sala N° 12	Sala N° 13	Sala N° 14	Sala N° 15	Sala N° 16	Sala N° 17	Sala N° 18	Sala N° 19	Sala N° 20	Sala N° 21
N°	N°	N°	N°	N°	N°	N°	N°	N°	N°	N°

Anexo N° 2

Fotografías digitales de los hocicos de recría y frigorífico, con su respectivo puntaje y graduación.

Recría

<p>CORNETES NASALES SIN LESIONES: EJEMPLO</p>	<p>Animal n° 1: 15 semanas Cornetes: 0 Tabique: 0 TOTAL: 0</p>	<p>Animal n° 2: 14 semanas Cornetes: 0 Tabique: 0 TOTAL: 0</p>
		
<p>Animal n° 3: 14 semanas Cornetes: 2 Tabique: 0 TOTAL: 2</p>	<p>Animal n° 4: 13 semanas Cornetes: 2 Tabique: 0 TOTAL: 2</p>	<p>Animal n° 5: 13 semanas Cornetes: 4 Tabique: 1 TOTAL: 5</p>
		
<p>Animal n° 6: 13 semanas Cornetes: 4 Tabique: 0 TOTAL: 4</p>	<p>Animal n° 7: 12 semanas Cornetes: 8 Tabique: 0 TOTAL: 8</p>	<p>Animal n° 8: 11 semanas Cornetes: 2 Tabique: 0 TOTAL: 2</p>
		

<p>Animal n° 9 : 10 semanas Cornetes: 4 Tabique: 0 TOTAL: 4</p>	<p>Animal n° 10 : 10 semanas Cornetes: 2 Tabique: 0 TOTAL: 2</p>	<p>Animal n° 11: 10 semanas Cornetes:1 Tabique: 0 TOTAL: 1</p>
		
<p>Animal n° 12: 9 semanas Cornetes: 4 Tabique: 1 TOTAL: 5</p>	<p>Animal n° 13: 10 semanas Cornetes: 2 Tabique: 0 TOTAL: 2</p>	<p>Animal n° 14 : 9 semanas Cornetes: 2 Tabique: 0 TOTAL: 2</p>
		
<p>Animal n°15 : 9semanas Cornetes:3 Tabique: 0 TOTAL: 3</p>	<p>Animal n° 16 : 8 semanas Cornetes:2 Tabique: 0 TOTAL: 2</p>	<p>Animal n° 17: 8 semanas Cornetes:2 Tabique: 0 TOTAL: 2</p>
		
<p>Anima n° 18 : 8 semanas Cornetes:4 Tabique: 0 TOTAL: 4</p>	<p>Anima n° 19 : 8 semanas Cornetes: 2 Tabique: 0 TOTAL: 2</p>	<p>Anima n°20 : 7 semanas Cornetes:12 Tabique: 0 TOTAL:12</p>
		

Animal n° 21 : 6 semanas
Cornetes: 2
Tabique: 0
TOTAL: 0



Animal n° 22: 5 semanas
Cornetes:0
Tabique: 0
TOTAL:0



Frigorífico

Animal n°1:
Cornetes: 2
Tabique: 0
TOTAL:2



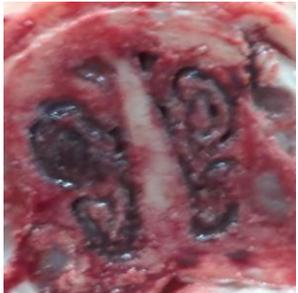
Animal n° 2
Cornetes: 5
Tabique: 0
TOTAL:5



Animal n° 3:
Cornetes: 1
Tabique: 0
TOTAL:1



Animal n°4:
Cornetes: 2
Tabique: 0
TOTAL: 2



Animal n° 5:
Cornetes: 3
Tabique: 0
TOTAL:3



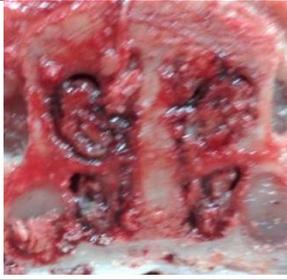
Animal n°6:
Cornetes: 3
Tabique: 0
TOTAL:3



Animal n° 7:
Cornetes: 2
Tabique:0
TOTAL: 2

Animal n°8:
Cornetes: 4
Tabique:1
TOTAL: 5

Animal n°9:
Cornetes: 6
Tabique: 0
TOTAL :6



Animal n° 10:
 Cornetes:3
 Tabique: 0
 TOTAL:3



Animal n° 11:
 Cornetes: 8
 Tabique:0
 TOTAL:8



Animal n°12:
 Cornetes: 2
 Tabique:0
 TOTAL:2



Animal n° 13:
 Cornetes: 0
 Tabique: 0
 TOTAL: 0



Animal n°14:
 Cornetes:0
 Tabique:0
 TOTAL:0



Animal n°15:
 Cornetes: 4
 Tabique: 0
 TOTAL:0



Animal n° 16:
 Cornetes: 2
 Tabique: 1
 TOTAL: 3



Animal n° 17:
 Cornetes: 4
 Tabique: 0
 TOTAL:4



Animal n° 18:
 Cornetes: 0
 Tabique: 0
 TOTAL: 0



Animal n°19:
 Cornetes: 4
 Tabique:0



Animal n°20:
 Cornetes: 2
 Tabique: 0



Animal n°21:
 Cornetes:4
 Tabique:0

TOTAL:4



TOTAL:2



TOTAL:4



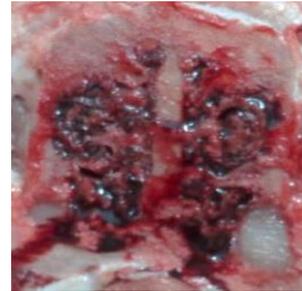
Animal n°22:
Cornetes:0
Tabique:0
TOTAL:0



Animal n° 23:
Cornetes:2
Tabique:0
TOTAL:2



Animal n 24°:
Cornetes: 5
Tabique: 0
TOTAL



Animal n°: 25
Cornetes: 3
Tabique:0

TOTAL:3



Animal n°: 26
Cornetes: 2
Tabique: 0

TOTAL:2



Animal n°: 27
Cornetes: 0
Tabique:0

TOTAL:0



Animal n°: 28
Cornetes: 6
Tabique:0
TOTAL:6

Animal n°: 29
Cornetes: 10
Tabique:0
TOTAL:10

Animal n°: 30
Cornetes: 4
Tabique:1
TOTAL:5



Animal n°: 31
 Cornetes: 2
 Tabique:0
 TOTAL:2



Animal n°: 32
 Cornetes: 0
 Tabique:0
 TOTAL:0



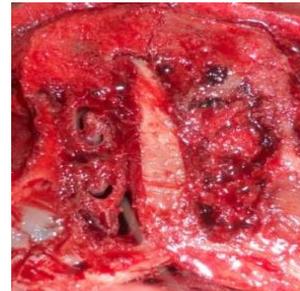
Animal n°: 33
 Cornetes: 6
 Tabique:2
 TOTAL:8



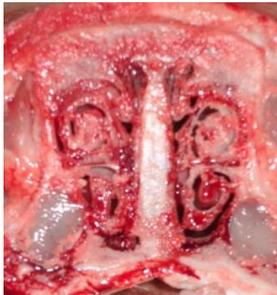
Animal n°: 34
 Cornetes:1
 Tabique:0
 TOTAL:1



Animal n°: 35
 Cornetes: 0
 Tabique:0
 TOTAL:0



Animal n°: 36
 Cornetes: 4
 Tabique: 2
 TOTAL:6



Animal n°: 37
 Cornetes: 6
 Tabique:0
 TOTAL:6



Animal n°: 38
 Cornetes: 2
 Tabique:0
 TOTAL:2



Animal n°: 39
 Cornete: 8
 Tabique:0
 TOTAL:8



Animal n°: 40
 Cornetes: 4
 Tabique:1
 TOTAL:5



Animal n°: 41
 Cornetes:0
 Tabique:0
 TOTAL:0



Animal n°: 42
 Cornetes: 2
 Tabique:0
 TOTAL:2



Animal n°: 43
Cornetes: 2
Tabique: 0
TOTAL: 2

