



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
MAESTRIA EN SALUD Y PRODUCCION PORCINA

**Comparación de lesiones pulmonares e índices productivos y económicos
en cerdos vacunados y no vacunados contra *Mycoplasma hyopneumoniae***

Trabajo de tesis para optar al grado de Magister en Salud y Producción Porcina por

Esp. M.V. Ismael Mario Dolso

Director: Pablo Jesús Tamiozzo, M.V., Mag, Dr.

Co-director: Karina Tiranti, Lic, PhD.

Abril

2019

RESUMEN

La Neumonía enzoótica porcina (NEP) es una enfermedad respiratoria crónica causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, que produce un gran impacto económico en la producción porcina debido, fundamentalmente a la pérdida en la ganancia diaria de peso (GDP) y la implementación de medidas de control. El tratamiento antibiótico y la vacunación son las herramientas de control más comúnmente utilizadas en nuestro país y el mundo. Una manera rápida y efectiva de realizar una prueba de efectividad de las vacunas utilizadas para el control del agente es la inspección de lesiones pulmonares en frigorífico que, en conjunto con algunos índices productivos y un análisis costo-beneficio pueden ser definitivas al momento de tener que elegir entre la vacunación u otra medida de control contra el agente.

Por ello se propuso en el presente trabajo comparar lesiones pulmonares en frigorífico, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia y retorno económico en cerdos no vacunados y cerdos vacunados contra el agente.

Para este fin entonces se trabajó en una granja de tres sitios de sanidad estándar con antecedentes de presencia del agente, en donde se vacunaba a las hembras. Se designaron tres grupos de cerdos, que recibieron los distintos tratamientos. El GRUPO A (control) que correspondía a la cantidad de cerdos destetados en cinco semanas, el GRUPO B (vacunados con una sola dosis a los 70 días de vida) que correspondía a 7 semanas de destete y el GRUPO C (vacunados con dos dosis a los 45 y 60 días de edad respectivamente), correspondiente a cuatro semanas de destete. Los pulmones de algunos cerdos de cada grupo fueron inspeccionados en frigorífico buscando lesiones causadas por neumonías de cualquier tipo y específicamente aquellas compatibles con *M. hyopneumoniae*. En base a lo observado en frigorífico se determinó la prevalencia de neumonías totales y de tipo proliferativa y se calculó el área pulmonar afectada de neumonías totales y de tipo proliferativa. Además, de cada grupo se recabó información de valores promedios GDP y conversión alimenticia (CA). Por último se realizó un análisis de retorno económico comparando el costo beneficio de la práctica de vacunación.

Hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los siguientes parámetros entre cerdos no vacunados y vacunados (independientemente del número de dosis): Proporción de neumonías totales y área pulmonar afectada total y proporción de neumonías proliferativas y área pulmonar afectada de éste tipo de neumonías, así como también entre los valores medios de GDP. No hubo diferencia significativa entre vacunar con una o dos dosis en ninguno de los parámetros analizados. El análisis de retorno económico fue más conveniente para la aplicación de una sola dosis de vacuna.

Debido a los resultados obtenidos se concluyó que la inspección de lesiones pulmonares en frigorífico es una herramienta útil y barata para el testeado de eficacia de vacunas y que la aplicación de una sola dosis de la bacterina utilizada es conveniente biológicamente para mitigar el impacto de la NEP y económicamente debido a los costos.

INDICE

1.	CAPITULO I. INTRODUCCION	
1.1.	La Neumonía Enzoótica Porcina	1
1.2.	El agente	2
1.3.	Aspectos epidemiológicos y dinámica de infección	2
1.4.	Principales estrategias de control de la Neumonía Enzoótica Porcina	4
1.4.1.	Medicación antibiótica	4
1.4.2.	Vacunas	6
1.5.	Diagnóstico	9
1.5.1.	Síntomas clínicos	9
1.5.2.	Aislamiento	9
1.5.3.	ELISA	10
1.5.4.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	12
1.5.5.	Lesiones pulmonares macroscópicas	12
1.5.5.1.	Inspección de lesiones pulmonares en frigorífico	13
1.5.5.2.	Número de Evaluaciones	14
1.5.5.2.	Número de animales a inspeccionar	14
2.	CAPITULO II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	16
2.1.	Hipótesis	16
2.2.	Objetivos generales	16
2.3.	Objetivos específicos	16
3.	CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS	17
3.1.	La granja y antecedentes de infección por <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	14
3.2.	Diseño experimental	20
3.2.1.	Composición de la vacuna	21
3.2.2.	Evaluación de lesiones pulmonares en frigorífico	21
3.2.3.	Cálculo del área pulmonar afectada (APA)	22
3.2.4.	Evaluación del desempeño productivo	24

3.2.5.	Análisis económico	25
3.2.6.	Análisis estadístico	25
4.	CAPITULO IV. RESULTADOS	26
4.1.	Lesiones pulmonares	26
4.2.	Índices productivos	32
4.3.	Retorno económico	33
5.	CAPITULO V. DISCUSIÓN	37
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	48
7.	ANEXOS	71

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. La Neumonía Enzoótica Porcina

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina (NEP), una enfermedad respiratoria crónica que afecta principalmente cerdos en las etapas de desarrollo-terminación y es una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria porcina (Thacker & Minion, 2012). Desde hace tiempo se ha informado una alta prevalencia de lesiones pulmonares compatibles con NEP en cerdos enviados a faena en diversas partes del mundo que van desde el 30% al 100% de cerdos afectados (Whittlestone, 1979; Switzer & Ross, 1975; Pointon *et al.*, 1990; Davies *et al.*, 1993).

En nuestro país también presenta una alta prevalencia (Zielinski, 1992; 1996; Perfumo *et al.*, 1994; Andrada & Ambrogi, 1994; Ambrogi *et al.*, 1996; Pelliza *et al.* 1998) presentándose en el 100% de las piaras en sistemas confinados, en el 76 % de sus animales y en el 86% de las granjas, en el 47% de los cerdos en sistemas al aire libre (Dolso *et al.*, 2000). El impacto de la enfermedad, radica no tanto por la mortalidad sino por la disminución en el aumento de la ganancia diaria de peso (GDP), ya que ha sido demostrado que por cada 10% de pulmón afectado existe una disminución en la ganancia diaria de peso de 37,4 grs (Straw *et al.*, 1989).

La NEP puede ser la puerta de entrada a otras bacterias, virus y/o parásitos. Se ha demostrado que la neumonía experimental por *M. hyopneumoniae* predispone a los cerdos a neumonía causada por *Pasteurella multocida* (Ciprian *et al.*, 1988; Amass *et al.*, 1994) y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Yagihashi *et al.* 1984), virus del PRRS (Thacker *et al.*, 1999), circovirus porcino tipo 2, virus de la enfermedad de Aujeszky, virus de Influenza.

1.2. El agente

M. hyopneumoniae pertenece al género micoplasma, que son los microorganismos de vida libre más pequeño que existen y pertenece junto con otros microorganismos a la clase *mollicutes* (Razin & Hayflick, 2010). El cultivo y aislamiento del microorganismo es lento y complejo y a pesar de ser considerado la prueba de oro es una técnica poco sensible debido a las exigencias nutricionales del agente. En caso de obtener el aislamiento, el mismo debe ser diferenciado de otros micoplasmas de los cerdos, como *M. flocculare* que presenta incluso similitudes antigénicas a *M. hyopneumoniae*. La diversidad antigénica entre cepas de *M. hyopneumoniae* fue identificada por primera vez por Frey (1992) y luego ratificada por Artiushin & Minion (1996) y Kokotovic et al. (1999). Con el advenimiento de nuevas tecnologías, en la era de la proteómica se ha avanzado aún más sobre el tema y se conoce mucho más acerca de tales diferencias (Pinto *et al.* 2007; 2009; Calus *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; 2010). Se ha demostrado también, diferencias en la virulencia entre cepas de campo de *M. hyopneumoniae* (Vicca *et al.*, 2003) y, más interesante aun, ha sido demostrado que ni la infección previa, ni la vacunación con cepas de *M. hyopneumoniae* de baja virulencia protegen de la infección con cepas de alta virulencia (Villareal *et al.*, 2009; 2011).

1.3. Aspectos epidemiológicos y dinámica de infección

El *M. hyopneumoniae* coloniza al lechón de manera temprana, pero por lo general los animales evidencian la enfermedad en la fase de desarrollo-terminación. En fases tempranas de diseminación del microorganismo, la microscopía electrónica de barrido (Mebus & Underdahl, 1977) y de transición de pulmones afectados con NEP reveló asociación del microorganismo con las cilias así como la importante pérdida de las mismas. Calsamiglia *et al.* (1999a) encontraron, en piaras donde no se controlaba *M. hyopneumoniae*, que la proporción de animales positivos a la PCR fue mayor que los animales positivos a la serología, especialmente durante la fase temprana de diseminación del microorganismo.

Un aparente retardo de la seroconversión en cerdos naturalmente infectados ha sido previamente descrita y diferentes intervalos han sido informados, variando de 4 a 9 semanas después de la exposición al agente (Sitjar *et al.*, 1996; Armstrong *et al.*, 1978) y es por esa variabilidad que es difícil determinar el momento de infección por serología, por lo que uso de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) usada en complemento a la serología es útil para determinar la dinámica de la enfermedad (Calsamiglia *et al.*, 1999a)

Diferentes estudios han demostrado que existe un intervalo entre la aparición de los signos clínicos o el pico de lesiones neumónicas y la seroconversión, que aumentan en casos a campo comparados con casos de descarga experimental (Armstrong *et al.*, 1978; Kobisch *et al.*, 1993). En una infección experimental con descarga intra-traqueal del microorganismo, la tos apareció 2 semanas post-infección haciendo pico a las 5 semanas y la seroconversión fue detectada 3 a 4 semanas post-infección, 2 semanas después de la tos (Kobisch *et al.*, 1993). Éste estudio, como otros (Sørensen *et al.*; 1997) muestran que la seroconversión en condiciones experimentales es más rápida que la seroconversión bajo condiciones naturales (Morris *et al.*; 1995; Andreassen *et al.* 2000)

Ruiz *et al.* (2002) en un intento de desarrollar un modelo cuantitativo para evaluar la colonización de *M. hyopneumoniae*, describe, utilizando PCR, que tanto en hisopados nasales como traqueales existen diferentes patrones de comportamiento de los animales, en los cuales son positivos primero, para luego negativizarse y volver a ser positivos finalmente. Más estudios son necesarios para comprender porque algunos cerdos son negativos al hisopado nasal, pero positivos al hisopado traqueal (o viceversa) al mismo tiempo. Asumiendo que esos cerdos son infectados en el mismo momento, una posible explicación de que esos animales tienen diferentes patrones de diseminación y que la misma no es un proceso lineal, pues la cantidad de *M. hyopneumoniae* diseminado depende de la habilidad del huésped para eliminarlo, combinada con la capacidad del microorganismo para adherirse a las ciliadas. Una explicación alternativa podría ser que algunos cerdos eliminan el agente y luego son re-infectados por sus compañeros de corral.

Finalmente, Sibila *et al.* (2004) en su estudio, utilizando nPCR también, demuestran la asociación entre la presencia de *M. hyopneumoniae* en distintos lugares del tracto respiratorio y lesiones en pulmón y concluye que si bien, el sitio que más

significativamente se asocia con las lesiones pulmonares son los bronquios, el hisopado nasal es un buen indicador de la presencia del microorganismo en los bronquios.

El uso de técnicas de diagnóstico presuntivas y de certeza han permitido el abordaje de la dinámica de la infección de *M. hyopneumoniae* en diferentes tipos de granjas alrededor del mundo (Sibila *et al.*, 2004; Fano *et al.*, 2007; Fablet *et al.*, 2011). Si bien las condiciones de producción en nuestro país no difieren sustancialmente al de otras partes del planeta, existen pocos antecedentes acerca de la dinámica del agente en piaras de nuestro país.

1.4. Principales estrategias de control de la Neumonía Enzoótica Porcina

En una reciente revisión bibliográfica (Maes *et al.*, 2008, 2018) se señalaron como principales estrategias de control de *Mycoplasma hyopneumoniae* la optimización de las prácticas de manejo y condiciones de alojamiento de los animales, la medicación antibiótica y la vacunación. Si bien los aspectos referidos al manejo de los cerdos, como el tipo de sistema de producción, el estado sanitario de animales que ingresan a las piaras, la densidad animal, el tamaño de la piara y las medidas de bioseguridad son aspectos muy importantes para el control de la enfermedad, están fuera del alcance de este estudio.

1.4. 1. Medicación Antibiótica

Los antibióticos activos contra *M. hyopneumoniae* incluyen tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, pleuromutilinas, fluoroquinolonas, florfenicol, aminoglucósidos y aminociclitolos (Hannan *et al.*, 1997; Maes *et al.*, 2018). Por carecer de pared celular, *M. hyopneumoniae* es resistente *per se* a los antibióticos que interfieren con la polimerización de los precursores de la pared celular, como los antibióticos beta-lactámicos, polimixinas, algunos macrolidos (como oleandomicina y eritromicina), rifampicina, y trimetoprim-sulfamidas (Maes *et al.*, 2018). Debido a la dificultad en el cultivo del agente, existen pocos estudios de resistencia adquirida. En este sentido, la resistencia ha sido informada para tetraciclinas, tilosina, tilmicosina, lincosamidas y fluoroquinolonas (Le Carrou *et al.*, 2006; Stakenborg *et al.*, 2005; Tavio *et al.*, 2014; Thongkamkoon *et al.*, 2013; Vicca *et al.*, 2007). A pesar de que en nuestro país no existen estudios de resistencia, podría

decirse que la resistencia adquirida no parece constituir un mayor problema para el tratamiento de infecciones por *M. hyopneumoniae* (Klein et al., 2017), aunque la situación puede ser diferente para otras bacterias que participan en infecciones secundarias.

Respecto al tratamiento, *M. hyopneumoniae* es sensible a varios antibióticos *in vitro*, así Wu et al. (1997) resaltaron la eficiencia de la tilmicosina y la enrofloxacina para su uso contra *M. hyopneumoniae*.

Ensayos *in vivo* señalan diferentes resultados. Thacker et al. (2000b) demostraron que la clortetraciclina fue efectiva en la prevención de lesiones y signos clínicos asociados con *M. hyopneumoniae* cuando se administró en el alimento antes de la infección, pero fue inefectiva o mucho menos efectiva cuando se administró de 10 a 24 días post-infección. Otros estudios también han demostrado la efectividad de la clortetraciclina (Wu et al., 2002), incluso también en infecciones mixtas con virus como el PRRS (Thacker et al., 2006) o el circovirus porcino tipo 2 (Opriessnig et al., 2006). La lincomicina en el alimento reduciría la incidencia y gravedad de la NEP según algunos autores (Thacker et al., 2002; Mateusen et al., 2001). La conveniencia del uso de la tiamulina no es del todo clara si bien son muchos los informes sobre su eficacia (Stipkovits et al., 2001; Thongkamkoom et al., 2002; Stipkovits et al., 2003; Burch et al., 2006; Markhanon et al., 2006; March et al., 2006). Hideki et al, en 2008, evaluó la susceptibilidad de diferentes drogas frente a diferentes cepas de *M. hyopneumoniae*, que fueron colectadas de cerdos provenientes de matadero, encontrando una alta sensibilidad *in vitro* de la Valnemulina y Tiamulina., en concordancia con Thongkmkoonn et al 2008., y Taylor D (2008) Aparentemente los beneficios de la tiamulina estarían potenciados por la clortetraciclina y la oxitetraciclina.

La resistencia antibiótica “a campo” ha sido informada para tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas y fluoroquinolonas (Le Carrou et al. 2006; Stakenborg et al. 2005; Vicca et al. 2004, 2007).

Macrólidos más modernos, como la Tylvalosin, ha demostrado ser eficiente para reducir la presencia de *M. hyopneumoniae* del tracto respiratorio (Ramis, et al. 2014, Pallsres et al.), como así trabajos *in vitro* (Jang J. et al. 2016), como en programas de erradicación por despoblamiento parcial (Marco E. te al 2013, Mark R. et al 2013, Dubord X. et al 2015,

Gamitromicina, es un macrólido semisintético que ha demostrado ser un antibiótico con buenos resultados para el tratamiento de *M. hyopneumoniae* (Kondo Y. et al 2016). Aunque el tratamiento antibiótico mejora el rendimiento y reduce la signología clínica y las lesiones pulmonares de los cerdos, generalmente los signos clínicos aparecen cuando cesa el tratamiento (Maes et al., 2018).

1.4.2. Vacunas

La vacunación contra *M. hyopneumoniae* es ampliamente utilizada para el control de la NEP. Las vacunas comerciales en su mayoría consisten en bacterinas (células enteras del microorganismo inactivadas con el agregado de algún adyuvante) que se administran por vía intramuscular (Maes et al., 2018).

Es una herramienta muy importante para el control de la enfermedad y son muchos los informes de sus beneficios (Maes *et al.* 2000; Keich *et al.*, 2001; Yeske, 2000; Zielinski, 1996). Todas las vacunas disponibles son bacterinas con diferentes adyuvantes y son ampliamente utilizadas a pesar de que los mecanismos de protección no se conocen bien, ya que existiría una respuesta inmune mediada por células y respuesta humoral (Thacker *et al.*, 2000).

La influencia de los anticuerpos maternos en la respuesta de la vacuna no ha sido definitivamente establecida. Los cerdos que poseen anticuerpos maternos pueden provocar una respuesta serológica baja después de la vacunación, pero los efectos sobre la eficacia de la vacunación no son claros y no existe consenso entre la edad óptima de vacunación (Rooke *et al.*, 2003; Thacker *et al.*, 2001a; Carranza *et al.*, 2004). Existen estudios que han probado la misma vacuna en cerdos de diferentes edades dentro de la misma granja, y sus resultados no han mostrado diferencias en la performance, pero hay una tendencia de que al vacunar más tardíamente, se obtienen mejores resultados (Jayappa *et al.*, 2001; Wallgren *et al.*, 2000).

La vacunación reduce la severidad de la infección, mitigando los signos clínicos y las lesiones pulmonares (Haesebrouck et al., 2004). A nivel individual, las vacunas comerciales reducen el número de microorganismos en el tracto respiratorio de los cerdos (Meys et al., 2006; Vranckx et al., 2012b) y a nivel poblacional, disminuye el nivel de

infección en las piaras (Sibila et al., 2007), aumento de la ganancia diaria de peso (8,2%) y mejora de la conversión alimenticia (2,5%), menor tiempo para llegar a peso faena, reducción de los signos clínicos, lesiones pulmonares, mortalidad y la mejora de la calidad de la canal (Maes et al., 1998, 1999). Sin embargo, estudios experimentales (Meyns et al., 2006) y a campo (Pieters et al., 2010; Villarreal et al., 2011) han demostrado que la vacunación confiere una reducción limitada en la relación de transmisión de *M. hyopneumoniae*.

Aunque las bacterinas son, como se dijo anteriormente, muy utilizadas, no se conoce el mecanismo exacto de acción. Algunos estudios sugieren que la inmunidad sistémica mediada por células cumple un papel muy importante en la protección (Thacker et al., 1997; Marchioro et al., 2013).

Generalmente se adoptan diferentes estrategias de vacunación, dependiendo del tipo de piara, sistema de producción, prácticas de manejo, patrón de infección y preferencias del productor (Maes et al., 2018). Podría decirse que existen dos grandes modos de utilizar la vacuna, una es la vacunación de las cerdas que confieren protección a su progenie mediante anticuerpos maternos y la otra es la vacunación de los lechones, con una o dos dosis.

Muchos estudios han investigado la eficacia de las bacterinas comerciales en condiciones de campo (Jensen et al., 2002, Roof et al., 2001; 2002; Alexopoulos et al., 2004; Lillie et al., 2004; Baccaro et al., 2006; Greiner et al., 2011). Sin embargo, para decidir sobre la implementación de la vacunación en una determinada piara, la decisión debe basarse no solo en los parámetros de eficacia, sino también en un análisis de costo-beneficio (Maes et al., 2003). El tipo de rebaño, el sistema de producción, el patrón de infección, el estado de salud de la población en riesgo y su fácil implementación a nivel práctico son las principales variables que juegan un papel en el diseño de una estrategia de vacunación exitosa.

Los programas de vacunación se han vuelto cada vez más complejos con la introducción de formulaciones de dosis únicas además de las formulaciones de dos dosis tradicionales. Las primeras bacterinas disponibles comercialmente requerían dos inyecciones intramusculares y se demostró que eran eficaces para controlar la enfermedad. Sin embargo, con la aparición de vacunas de dosis única, que se confirmaron tan eficaces como las formulaciones de dos dosis (Kriakis et al., 2001; Dawson et al., 2002), las nuevas

bacterinas se hicieron más populares. Esto se debió principalmente a la reducción de los costos de mano de obra, la fácil implementación a nivel de la granja, menos estrés infligido a los cerdos, mientras que se confiere una protección similar cuando se compara con las vacunas de dos vacunas (Roof et al., 2001; 2002 Alexopoulos et al., 2004; Lillie et al., 2004; Baccaro et al., 2006; Greiner et al., 2011). A pesar de la eficacia aceptable de las vacunas de dosis única, todavía hay algunas situaciones en las que se pueden indicar formulaciones de dos dosis (Yeske et al., 2001). Estas situaciones incluyen períodos críticos y sistemas de producción (múltiples fuentes, múltiples edades, flujo continuo) con niveles de infección críticos.

Actualmente, la disponibilidad de secuencias genómicas completas ha contribuido a un nuevo enfoque en el desarrollo de vacunas (Scarselli et al., 2005), llamado vacunología reversa (Rappuoli, 2001). El enfoque de vacunología reversa comienza a partir de la secuencia genómica y, por análisis computarizado, predice aquellos antígenos que tienen más probabilidades de ser candidatos vacunales. Este método se puede usar para el desarrollo de vacunas tanto de subunidades proteicas como de ADN. El uso de proteínas recombinantes contribuyó al desarrollo de vacunas de subunidades. Las vacunas de subunidades recombinantes se basan en fracciones del organismo y se producen utilizando sistemas de expresión de proteínas heterólogas. Los antígenos específicos de *M. hyopneumoniae* incluyen proteínas de superficie (P46, P65, P97), proteínas citosólicas (P36) y enzimas funcionales (L-lactato deshidrogenasa, ribonucleótido reductasa) (Kim et al., 1990; Strasser et al., 1991; Futo et al., 1995; Zhang et al., 1995; Fagan et al., 1996), y pueden ser considerados como posibles candidatos a vacuna. Recientemente, varias vacunas experimentales de subunidades recombinantes se han desarrollado y probado para respuestas inmunes en ratones (Marchioro et al., 2012) o en cerdos (Marchioro et al., 2014). Las vacunas de subunidades recombinantes podrían representar una estrategia prometedora para desarrollar vacunas más efectivas contra *M. hyopneumoniae*.

En nuestro país existen distintos inmunógenos, en presentación monovalentes con distintos adyuvantes o mixtas para administración en dosis única o con refuerzo. Entre los productos monovalentes están aquellos compuestos por suspensiones inactivadas de *Mycoplasma hyopneumoniae* adyuvantadas con Carbopol, aceite mineral o ImprantFlex. En general se administran en dosis de 1-2 ml IM a lechones entre 7 días a 3-5 semanas de edad. Dentro de

las combinadas se cuentan suspensiones inactivadas de *M. hyopneumoniae* con *Haemophilus parasuis* serotipo 4 y 5 y *M. hyopneumoniae* con Circovirus porcino tipo 2 que se administra en esquemas vacunales similares a los enunciados anteriormente (Cappuccio et al., 2017).

Conjuntamente con el uso estratégico de antibióticos, el uso de vacunas, administradas bajo diferentes esquemas, constituyen una de las principales herramientas de control contra el agente en nuestra región.

1.5. Diagnóstico

1.5.1. Síntomas clínicos

La NEP se caracteriza por ser una enfermedad de alta morbilidad y baja mortalidad siendo susceptibles los cerdos de todas las edades. Generalmente la enfermedad no se observa en animales menores de 6 semanas de edad (Thacker & Minion, 2012). La enfermedad se caracteriza principalmente por tos no productiva, y por el impacto en la pérdida de la ganancia de peso antes citada. Si bien la tos es un síntoma inespecífico y subjetivo, la cuantificación de este signo podría ser útil para el diagnóstico presuntivo de la NEP, utilizado conjuntamente con otras técnicas como ELISA y PCR (Nathues *et al.*, 2012).

1.5.2. Aislamiento

El aislamiento del microorganismo constituye la “prueba de oro” o test diagnóstico de referencia. *M. hyopneumoniae*, -como otros micoplasmas- crece pobremente en el mejor de los medios de cultivo ya que han perdido a lo largo de la evolución los genes para la biosíntesis de aminoácidos, lo que los hace totalmente dependientes de éstos, y deben ser provistos de forma exógena (Razin & Hayflick, 2010). También tienen requerimientos de ácidos nucleicos precursores. Los medios de cultivo usualmente utilizados están basados en infusión de cerebro-corazón, extracto de levadura y sueros con varios suplementos. Los sueros proveen, entre otros nutrientes, colesterol y ácidos grasos (requeridos para la síntesis de membrana). Los requerimientos nutricionales de los micoplasmas dictaminan la utilización de medios de cultivo complejos, pero hay que tener en cuenta, en algunos casos,

que la falta de crecimiento en los medios de cultivos ricos, no resulta de la falta de nutrientes, sino de la presencia de componentes tóxicos que benefician a algunos microorganismos y perjudican a otros (peptona y extracto de levadura).

Es importante considerar que carece de pared celular y de espacio periplásmico, por lo que la membrana es muy sensible a cambios osmóticos, esto es muy importante a la hora de la toma de muestras.

Han sido descritos varios métodos para el aislamiento de *M. hyopneumoniae* (Goodwin, 1972; Friis, 1975; Etheridge *et al.*, 1979). Ross & Whittlestone (1983) señalan como medios ácidos más probados a los caldos propuestos por Friis (1975) y Goodwin (1965). El medio descrito por Friis (1975) es el más utilizado alrededor del mundo.

1.5.3. ELISA

El uso de pruebas serológicas para identificar a los animales que han desarrollado una respuesta inmunitaria a patógenos específicos es una herramienta importante en la gestión y prevención de enfermedades. Las pruebas serológicas se utilizan ampliamente para el control de infecciones causadas por ambos agentes.

Son varias las pruebas serológicas utilizadas para detectar *M. hyopneumoniae*; prueba de hemoaglutinación indirecta (HI); prueba de fijación del complemento (FC); y varios formatos de ensayo de inmunoenlace (por las siglas en inglés de Enzyme linked immunosorbent assay- ELISA) (Ross y Whittlestone, 1983). Debido a la sensibilidad, especificidad y duración de la respuesta de los anticuerpos, ELISA es el más usado. Nicolet *et al.* (1980) desarrollaron un ELISA basado en el uso de extracto de *M. hyopneumoniae* con Tween 20. La opinión de otros autores (Bereiter *et al.*, 1990; Bolske *et al.*, 1990; Kazama *et al.*, 1989) acerca de este ELISA es que tiene ventajas sustanciales sobre otras pruebas descritas previamente.

Se ha usado ELISA-Tween 20 para detectar anticuerpos en suero y calostro de hembras provenientes de piaras infectadas. Rautiainen *et al.* (2001), utilizando el mismo ELISA-Tween 20 informaron que los anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* persisten por tres años o más en algunas hembras y concluyeron que era un método sensible y conveniente para monitorear piaras.

En un estudio a campo, Sørensen *et al.* (1993), usando el mismo ELISA-Tween 20, observaron que dos grupos de cerdos seronegativos, se volvieron positivos en promedio de 6 a 9 semanas después de haber introducido a la piara dos animales positivos.

Usando el mismo ELISA, Andreasen *et al.* (2000) fueron capaces de detectar anticuerpos maternos en lechones de más de 7 semanas de edad. La vacunación de las hembras antes del parto puede aumentar el tiempo de anticuerpos maternos que podrían ser detectados en los lechones. Thacker *et al.* (2000) vacunaron hembras 3 veces antes del parto, y los lechones de esas hembras fueron positivos por más de 9 semanas de edad, cuando uso una ELISA-Tween20. En otro estudio, hembras de piaras naturalmente infectadas fueron vacunadas pre-parto y sus lechones fueron aislados el día 15 al 17 de edad (Jayappa *et al.*, 2001). Los anticuerpos maternos fueron detectados por diferentes ELISAs hasta las 15 semanas de edad. Comparando 4 vacunas y usando ELISA Tween-20, Thacker *et al.* (1998) encontraron que algunas vacunas producían altos títulos y más lechones seropositivos que otras, y que algunos cerdos vacunados fueron seronegativos hasta cerca de los 40 días post infección.

Feld *et al.* (1992) desarrollaron un ELISA de bloqueo basado en el uso de un anticuerpo monoclonal biotinilado contra un polipéptido de 74 K-Da del *M. hyopneumoniae*. Usando un ELISA de bloqueo con anticuerpo monoclonal, un cerdo resultó positivo a los ocho días postinfección, la mayoría de los cerdos se volvieron positivos a los 22 días postinfección y todos los cerdos fueron positivos a los 46 días post-infección, hecho que implica la rápida detección de anticuerpos por este tipo de ELISA. Al igual que el ELISA Tween20 y el de bloqueo, otro ELISA indirecto ha informado excelentes resultados (Sorensen *et al.* 1997) con la importante ventaja de estar disponible comercialmente en nuestro país.

La serología, particularmente el ELISA, a pesar de ser una herramienta diagnóstica de elección para determinar lo que ocurre en las piaras, dado el retardo en la seroconversión, el hecho de que no todos seroconvierten y la poca sensibilidad de las técnicas (Erlandson *et al.*, 2005) no necesariamente refleja lo que ocurre en las granjas

1.5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Hoy se dispone de la secuencia genómica completa de cuatro cepas de *M. hyopneumoniae* (Minion et al., 2004; Vasoncelos et al., 2005; Liu et al., 2011). Esto hace posible la selección de una gran variedad de secuencias blanco.

El acceso al ADN de *M. hyopneumoniae* es relativamente fácil pues carece de pared celular, sin embargo algunas muestras clínicas pueden tener inhibidores de la reacción de PCR (Gibb et al., 1998; Deneer et al., 1993; Reznikov et al., 1995; Wadowsky et al. 1994).

La técnica de PCR se adecua perfectamente para el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* por ser sensible al detectar poca cantidad de microorganismos, específica, pues está basada en la detección de un código genético único del agente, rápida, comparada con otros métodos, como el cultivo por ejemplo, y es una excelente herramienta de monitoreo al ser utilizada en piaras libres del agente, pudiéndose realizar en animales tanto vivos como muertos.

Varias pruebas de PCR de muestras clínicas como hisopados nasales o lavados traqueo-bronquio-alveolares han sido descritas (Mattsson et al., 1995; Blanchard et al., 1996; Baumeister et al., 1998; Caron et al., 2000), incluso se ha reportado PCR tomando como muestra aire de las instalaciones (Stärk et al., 2000). La nPCR implica una doble amplificación aumentando de esa manera la sensibilidad, la especificidad y diluyendo posibles factores inhibidores de la reacción, presentes en las muestras clínicas y su uso ha sido ampliamente descrito para *M. hyopneumoniae* (Harasawa et al., 1991; Stark et al., 1998; Calsamiglia et al., 1999a; Verdin et al., 2000; Kurth et al., 2002).

1.5.5. Lesiones pulmonares macroscópicas

Las lesiones macroscópicas de NEP consisten en consolidaciones que van desde el color violáceo a grises en áreas cráneo-ventrales del pulmón. Las lesiones tienden a asentarse en las porciones ventrales de los lóbulos apicales, cardíacos y del lóbulo accesorio, y en la parte craneal de los lóbulos diafragmáticos aunque puede extenderse a lo largo de todo el pulmón en casos graves. En ausencia de infecciones secundarias, las lesiones tienden a ser focales y bastante bien delimitadas. En presencia de otros

organismos, las lesiones se vuelven más difusas y difíciles de diferenciar de la producida por otros agentes patógenos (Thacker & Minion, 2012).

1.5.5.1. Inspección de lesiones pulmonares en frigorífico

La evaluación de las enfermedades respiratorias en matadero se utiliza diferentes escalas con frecuencia para estimar la incidencia y/o prevalencia de la NEP y de otras enfermedades respiratorias, y estimar de alguna manera, su impacto en la carcasa. En el cerdo, los pulmones están divididos por fisuras profundas en siete lóbulos: el pulmón derecho comprende los lóbulos apical, cardíaco, diafragmático e intermedio: el pulmón izquierdo comprende los lóbulos apical, cardíaco y diafragmático. Los lóbulos apical y cardíaco izquierdos no están separados por una fisura, sino sólo por la muesca cardíaca (Christensen *et al.*, 1999).

Han sido propuestos varios *scores* o escalas de lesiones pulmonares (Piffer, *et al.*, 1993; Hannan *et al.*, 1982; Morrison *et al.*, 1985; Straw *et al.*, 1986; Christensen *et al.*, 1999), cada uno con su particularidad pero en definitiva todos utilizados para el mismo fin. Varios trabajos demostraron que el pulmón derecho contribuye con más de la mitad del peso pulmonar total. (Morrison *et al.*, 1985, Christensen *et al.*, 1999). Piffer *et al.*, (1993), determinaron el peso relativo de los lóbulos pulmonares de los cerdos en relación al peso total del pulmón, concluyendo que el lóbulo apical derecho representa el 11% del peso pulmonar total al igual que el cardíaco derechos contribuyen, mientras que el lóbulos apical izquierdo contribuyen al 6%, al igual que el cardíaco izquierdo, el lóbulo diafragmático derecho al 34%, el diafragmático izquierdo al 27% y el lóbulo intermedio al 5%. En este sentido, un reciente estudio demostró una alta correlación entre los citados métodos para puntuar las lesiones pulmonares y observó también que la correlación más alta fue observada entre aquellos métodos que ponderan el área o el peso de cada lóbulo pulmonar (García-Morante *et al.*, 2016).

El propósito de monitorear las enfermedades respiratorias es transformar los fenómenos observados en una población porcina a valores numéricos adecuados para el análisis. La evaluación del nivel de enfermedad y el efecto de medidas terapéuticas o preventivas puede observarse monitoreando los niveles de enfermedad en un determinado

momento (prevalencia) o durante períodos determinados (incidencia) (Christensen *et al.*, 1999). Los controles en frigorífico pueden ser una herramienta suplementaria provechosa para manejar problemas respiratorios.

El estudio postmortem sistemático de los animales que mueren en la granja, en asociación con la inspección de los cerdos durante la faena en frigorífico, es una rutina que permite: 1) Diagnóstico de infecciones subclínicas, 2) Estudios poblacionales más representativos de los agentes infecciosos presentes en la granja, 3) Estudios de prevalencia, 4) Control de la efectividad de las medidas profilácticas o curativas utilizadas en la granja, 5) Determinación de los distintos tipos, localización y extensión de las lesiones neumónicas y 6) Su correlación (negativa o positiva) con parámetros productivos.

1.5.5.2. Número de Evaluaciones

Con respecto al número de evaluaciones a realizar, es importante considerar, con referencia a los cuadros respiratorios, que existen variaciones estacionales que es necesario minimizar, por lo que es aconsejable realizar al menos cuatro controles anuales. En función al número de madres, la frecuencia de inspección a realizar, van desde dos inspecciones al año para establecimiento de 50-100 madres a 5,5 para una granja de más de 500 hembras. (Pointon *et al.*, 1990).

1.5.5.3. Número de animales a inspeccionar

Con relación al número de animales a inspeccionar, dependerá de los objetivos así como también de la prevalencia estimada del evento y es de importancia para la extrapolación estadística (Christensen *et al.*, 1999). Para estimar el número de animales a inspeccionar existen diferentes procedimientos, el primero es la selección al azar de 30 cerdos como mínimo, independientemente del tamaño de la granja, siempre que dichos animales estén en el mismo ambiente y con igual manejo. Si no es así se deberían inspeccionar los pulmones de otros 30 cerdos (Morrison *et al.*, 1985; Straw *et al.*, 1989). Una segunda alternativa comprende una variación del primero. Para una mejor correlación con parámetros productivos, es la selección, inspección y evaluación de pulmones de al

menos 15 cerdos que por la edad tienen que ir a mercado, pero que están retrasados, y un número equivalente de cerdos de igual edad pero con peso de faena adecuado.

Por un lado, el uso de vacunas representa una alternativa interesante para el control de la NEP, y de otras enfermedades que afectan a los porcinos, ya que reduciría el uso y mal uso de antibióticos. En este sentido, si bien en nuestro país no existen aún leyes que prohíban el uso masivo de antibióticos en animales destinados al consumo humano, en Estados Unidos de Norteamérica y Europa, las leyes se están tornando cada vez más rigurosas, lo que tiene su asidero en la aparición cada vez más frecuente de infecciones causadas por bacterias multirresistentes.

Por otro lado, para la evaluación de la eficacia de tales vacunas, el monitoreo de lesiones pulmonares en frigorífico representa una alternativa interesante puesto que es económica y provee información interesante acerca del impacto de la enfermedad. Esto sumado al análisis de algunos datos productivos, que toda explotación porcina debe recabar para una producción eficiente y que tampoco representan un gasto adicional para el productor fortalecen el análisis de la eficacia de la vacuna. Finalmente, la implementación de la vacunación, como cualquier otra práctica de control de la NEP u otras enfermedades, debe ser evaluada económicamente, para que su aplicación resulte redituable para el productor.

CAPITULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

En una granja porcina de alto estado sanitario, el uso de vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* disminuye las lesiones pulmonares, mejora algunos índices productivos y es económicamente redituable.

2. Objetivos

Objetivo general

Comparar lesiones pulmonares en frigorífico, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia y retorno económico en cerdos no vacunados y cerdos vacunados contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

Objetivos específicos

1. Comparar el área pulmonar afectada y la proporción de pulmones con lesiones compatibles con neumonía enzoótica porcina en frigorífico, en cerdos no vacunados vs cerdos vacunados con una o dos dosis de bacterina contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

2. Comparar ganancia diaria de peso y conversión alimenticia en cerdos no vacunados vs cerdos vacunados con una o dos dosis de bacterina contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

3. Determinar el retorno económico logrado en cerdos no vacunados vs cerdos vacunados con una o dos dosis de bacterina contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. La granja y antecedentes de infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*

El estudio se realizó en una granja porcina de tres sitios de 1200 madres, ubicada en Santa Eufemia, departamento de Juárez Celman, provincia de Córdoba. En el Sitio I se encontraba el galpón de gestación y las salas de maternidad y el galpón de aclimatización de las cachorras.

A 2,5 km del Sitio I, se encontraba el Sitio II, que poseía ocho galpones con capacidad para 650 cerdos cada uno. Cada galpón recibía lechones correspondientes a una semana de destete. Los lechones eran destetados y trasladados a sitio II a los 21 días de edad, con un peso promedio de 5,5 Kg y permanecían allí hasta los 70 días de vida con un peso promedio de 27 Kg. En el sitio II se realizaba un manejo todo adentro- todo afuera de los animales.

A dos kilómetros del sitio II se encontraba el Sitio III, que poseía ocho galpones, con capacidad de 1300 animales cada uno (cantidad de animales correspondiente a dos semanas de destete). Los cerdos eran alojados aquí desde los 70 días de vida hasta su venta (160-165 días de vida), con un peso promedio de 105 kg (Foto 1).



Foto 1. Imagen satelital del predio en la parte superior y del sitio III (lugar donde se realizó el estudio) en la parte inferior.

Al tratarse de una granja libre de la enfermedad del virus de Aujeszky y Brucelosis, se recertificaba tal estado cada cuatro meses por serología, de acuerdo a la legislación vigente. Se vacunaba contra *E.coli* y *Clostridium perfringens* tipo C (Litterguard®LT-C, Pfizer) a las hembras a los 90 días pre-parto. Se utilizaba una autovacuna, doble dosis contra *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* a los 45 y 62 días de vida de los lechones. Se realizaba tratamiento antibiótico en ración (350 ppm de amoxicilina, genérica) en pulsos de 8-10 días entre los 21-28, 60-70 y 121-128 días de edad.

El esquema de vacunación contra *M. hyopneumoniae* que la granja tenía implementado, era vacunación de las madres a los 90 días de gestación y a las cachorras pre-servicio con doble dosis a los 180 y 200 días de edad. Se utilizaba la vacuna M+Pac®, del Laboratorio Schering Plough.

Previo al comienzo del estudio y para determinar el momento óptimo de vacunación en el desarrollo del mismo se realizó un perfil serológico de la siguiente manera: Se realizó un muestreo transversal en un galpón, donde se tomaron muestras de sangre de 20 animales a los 6, 20, 60, 80, 113 y 150 días de vida. Todos los animales muestreados eran hijos de madres vacunadas contra *M. hyopneumoniae* de acuerdo al esquema previamente descrito. Una vez separado el suero, el mismo fue testeado con el kit de ELISA de Herd Check *Mycoplasma hyopneumoniae* de Laboratorios IDEXX (Ver ANEXO I). Con esta información (Ver seroperfil en ANEXO II) se diseñó el plan de vacunación para lechones, en el que se definió vacunar con una dosis única a los 70 días de vida y a animales con dosis a los 45 y 60 días de vida. Esta decisión se tomó en base a los siguientes ítems: a) Los cerdos ingresaban a sitio III a los 70 días de vida, que coincidía con el momento de la vacunación con una sola dosis, b) El porcentaje de animales positivos a los 70 días de vida (por anticuerpos calostrales) era muy baja, lo que aseguraba no tener interferencia con anticuerpos maternos, c) La edad de infección, que se infirió, era alrededor de los 113 días, debido a que en el perfil serológico se observó una seroconversión entre los 113 y 150 días de vida, y d) Los animales que recibieron dos dosis se vacunaron según indicaciones del laboratorio fabricante de la vacuna.

3.2. Diseño experimental

Los grupos fueron:

GRUPO A: Control, sin vacunación, con un total de 6.500 cerdos, correspondientes a diez galpones de sitio II (o cinco galpones y medio del sitio III).

GRUPO B: Animales que recibían una sola dosis de vacuna a los 70 días de edad, con un total de 9.100 cerdos correspondientes a 14 galpones de sitio II (o siete galpones de sitio III).

GRUPO C: Animales que recibieron dos dosis de vacuna a los 45 y 60 días de edad, correspondiendo a 5.200 cerdos de ocho galpones de sitio II (o cuatro galpones de sitio III).

Se realizó un estudio de cohorte de 16 semanas de duración. Para ello se siguieron desde el destete hasta la faena diferentes cohortes de animales que correspondían a una semana de producción (un total de 20.800 animales) del siguiente modo:

Las primeras cuatro semanas se midieron las variables en el GRUPO B (una dosis de vacuna contra *M. hyopneumoniae*), las siguientes cuatro semanas se midieron las variables en el GRUPO C (dos dosis de vacuna contra *M. hyopneumoniae*), las siguientes cinco semanas en el GRUPO A (control, sin vacuna) y las últimas tres semanas en el GRUPO B (una dosis de vacuna contra *M. hyopneumoniae*) nuevamente (Tabla 1). De ahora en adelante, los resultados de cada grupo seguido serán identificados con los números correspondientes a la semana.

Semana*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Grupo	B	B	B	B	C	C	C	C	A	A	A	A	A	B	B	B

Tabla 1. Distintos grupos de tratamiento, según fueran vacunados contra *M. hyopneumoniae* con una sola dosis (GRUPO B), con dos dosis (GRUPO C) o el grupo control, sin vacunar (GRUPO A), de acuerdo a la semana.

*Semanas calendario desde el comienzo del estudio.

3.2.1. Composición de la vacuna

Se utilizó la vacuna M+Pac® del laboratorio Schering Ploug, con la siguiente composición: cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivado $\geq 1,47$ VRP (Unidad Relativa de Potencia definida respecto a una vacuna de referencia); aceite mineral ligero: 0,134 ml; oleato de sorbitán: 0,023 ml; polisorbato 80: 0,043 ml; aluminio (como hidróxido) 1,00 mg; tiomersol: 0,10 mg; Exp. Csp.: 1,00 ml

3.2.2. Evaluación de lesiones pulmonares en frigorífico

De cada galpón en ensayo se inspeccionaron los primeros animales terminados que salían a frigorífico (denominado animales cabeza) y los últimos en terminarse (denominado cola). Para determinar el n de pulmones de cerdos inspeccionados se aplicó un muestreo probabilístico sistemático (Thrusfield *et al.*, 2001), de acuerdo al siguiente criterio: Si eran enviados a faena menos de 30 animales se inspeccionan los pulmones de todos los cerdos, si eran enviados entre 31 y 40 cerdos se inspeccionaban los pulmones de 1 cada 2 animales, si eran enviados entre 41 y 150 cerdos se inspeccionaban los pulmones de 1 cada 3 animales y, finalmente, si eran enviados a faena más de 151 animales se inspeccionaban los pulmones de 1 cada 4 animales.

Los pulmones de los animales seleccionados fueron inspeccionados en busca de cualquier tipo de lesión pulmonar macroscópica no diferenciada (LPMND) y de lesión pulmonar proliferativa craneoventral compatible con NEP (LPPC-NEP). Las lesiones de los pulmones inspeccionados se registraban en una planilla codificada, en un programa que emite informes del porcentaje de lesión por lóbulo, porcentaje de lesión por total del pulmón y el promedio para cada tipo de lesión para el conjunto de los pulmones enviados a matadero en cada inspección.

Toda la información fue procesada en un programa denominado SISPOR, perteneciente al Dpto. de Patología Animal, Grupo Salud Porcina, de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

3.2.3. Cálculo del área pulmonar afectada (APA)

El programa utilizado calcula el área pulmonar afectada (APA), ponderando de manera diferente la extensión de la lesión pulmonar para cada uno de los lóbulos, según la participación de los mismos en el peso total del pulmón. El método empleado para la ponderación pulmonar fue informado por Piffer *et al.* (1993). El porcentaje afectado (extensión de la lesión) de cada uno de los lóbulos pulmonares (Figura 1) se multiplicó por su peso relativo obteniendo así el APA por lóbulo (Tabla 2), luego se realizó la sumatoria de los valores de APA por lóbulo obteniendo el APA total por animal y el promedio para cada GRUPO inspeccionado en frigorífico. La inspección se realizó visualmente y por palpación (Foto 2). Toda alteración considerada lesión era sometida a la prueba de docimasia pulmonar. Se consideró lesión de tipo proliferativa a toda lesión deprimida en relación con la superficie del pulmón, de un color que varía del rojo violáceo a amarronado y firme al tacto (Foto 3).

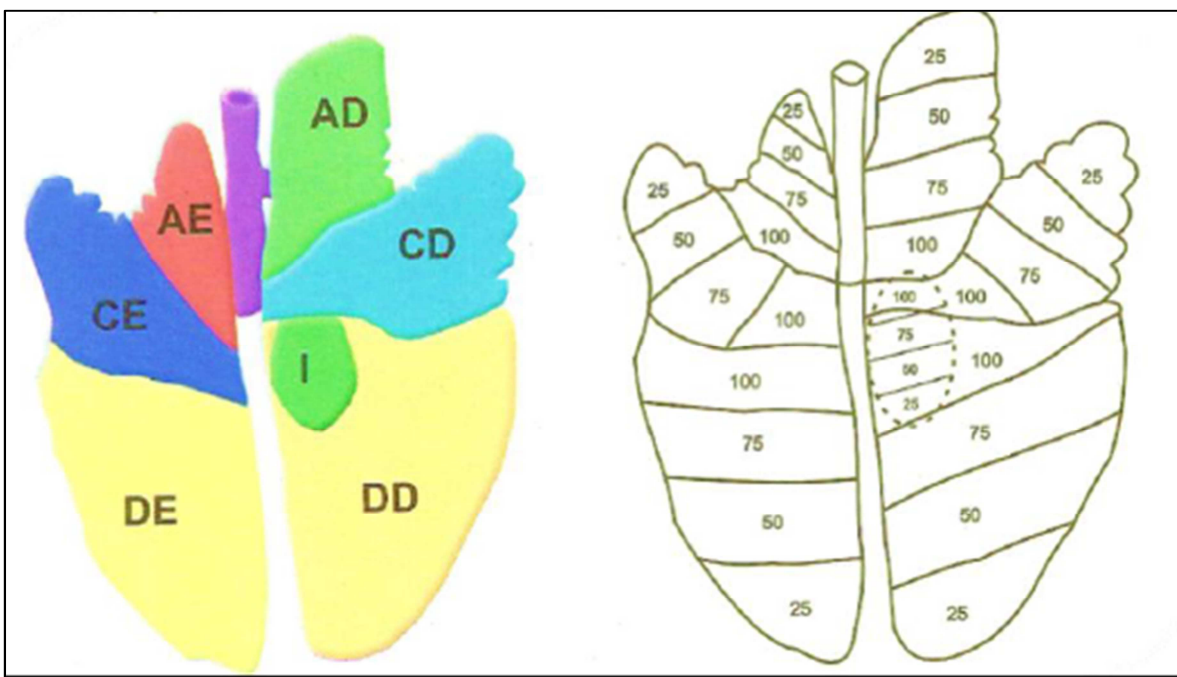


Figura 1. Dibujo esquemático del pulmón de cerdo en posición dorsal (izq). AE: Lóbulo apical izquierdo, CE: Lóbulo cardíaco izquierdo, DE: Lóbulo diafragmático izquierdo, AD: Lóbulo apical derecho, CD: Lóbulo cardíaco derecho, DD: Lóbulo diafragmático derecho, I: Lóbulo Intermedio. División imaginaria de los lóbulos pulmonares en cuatro partes (der). Tomada de Sobestiansky, 2000.

Lóbulo Pulmonar	Porcentaje (%) de participación en el peso pulmonar total
Apical derecho (AD)	11
Cardíaco derecho (CD)	11
Diafragmático derecho (DD)	34
Apical izquierdo (AI)	6
Cardíaco izquierdo (CI)	6
Diafragmático izquierdo (DI)	27
Intermedio (I)	5

Tabla 2. Porcentaje (%) de participación de cada lóbulo en relación al peso total del pulmón.



Foto 2. Inspección visual de pulmon en frigorífico.

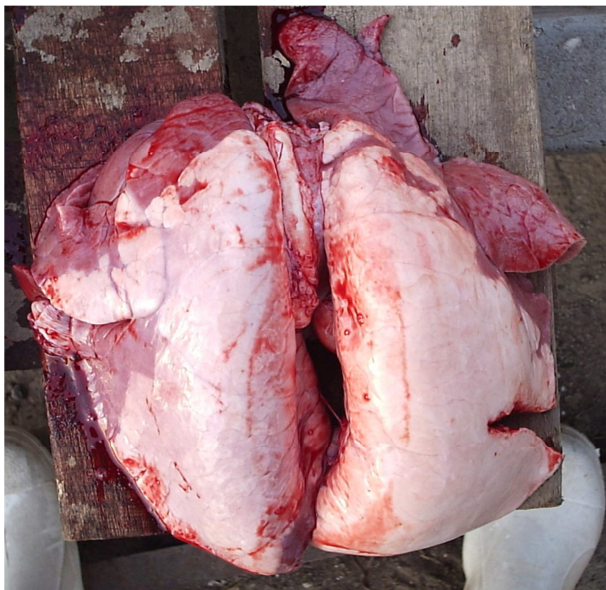


Foto 3. Neumonía de tipo proliferativa a toda lesión deprimida en relación con la superficie del pulmón, con color rojo violáceo-amarronado.

3.2.4. Evaluación del desempeño productivo

Para cada galpón de sitio III (considerando sólo la etapa de terminación) se tomaron los pesos de ingreso (Kg.), edad promedio ingreso (días), edad promedio de salida (Kg) y Kg ganados en la etapa de terminación con el fin de calcular la Ganancia diaria de peso (GDP). Además se registraron los kilos de alimento dado en lo que duraba la etapa de sitio III para el cálculo de conversión alimenticia (CA). Los cálculos se realizaron del siguiente modo:

$$\text{GDP} = (\text{kgs salidas} - \text{kilos ingresados}) / \text{Días en la etapa en sitio III}$$

$$\text{CA} = \text{Kilos de alimento consumido en la etapa} / \text{kilos ganados en la etapa}$$

3.2.5. Análisis económico

Se recabaron los siguientes datos: Kg de cerdo producidos en la etapa de terminación, precio a la venta por animal (Kg), Kg de alimento consumido en la etapa de terminación, precio del alimento y costo de la vacuna. Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Retorno Económico} = (\text{Kg producidos} * \text{precio venta}) - (\text{Kg alimento consumido} * \text{precio de alimento} + \text{costo vacuna})$$

3.2.6 Análisis estadístico

La proporción de lesiones pulmonares totales y lesiones pulmonares tipo proliferativas fueron comparadas entre cerdos sin vacunar (GRUPO A) con cerdos vacunados (independientemente del número de dosis- GRUPOS B y C). Sólo las medias de APA correspondientes a lesiones pulmonares tipo proliferativas fueron comparadas entre cerdos sin vacunar (GRUPO A) con cerdos vacunados (independientemente del número de dosis- GRUPOS B y C). Estos análisis fueron realizados mediante un test exacto de Fischer (comparación de proporciones independientes).

Las medias de GDP y CA fueron comparadas entre cerdos sin vacunar (GRUPO A) con cerdos vacunados (independientemente del número de dosis- GRUPOS B y C) mediante un test exacto de Fischer utilizando el programa Epidat (comparación de medias independientes).

El grado de correlación Pearson entre GDP, CA con respecto a la prevalencia de lesiones pulmonares tipo proliferativas fue analizado por grupo (sin vacunar (GRUPO A) vs cerdos vacunados (GRUPOS B y C, independientemente del número de dosis). Para ello se utilizó el programa SAS System for Windows 9.0.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Lesiones pulmonares

Dentro del GRUPO A (grupo control), el total de cerdos enviados a faena fue 1641, de los cuales se inspeccionaron pulmones de 591 animales. De estos animales, 151, 82, 104, 120 y 134 correspondían a los galpones de engorde 9, 10, 11, 12 y 13 respectivamente (Tabla 3). Dentro de cada subgrupo (galpones/semanas) hubo diferencias en cuanto a las lesiones pulmonares, así, el porcentaje de pulmones con lesión pulmonar macroscópica no diferenciada (LPMND) estuvo entre 70,8 y 90,2% (promedio 77,6%) y el porcentaje de pulmones con lesión pulmonar proliferativa craneoventral compatible con NEP (LPPC-NEP) estuvo entre 64,1 y 87,8% -promedio 73,2%- (Tabla 3; Tabla 4). El APA total estuvo entre 3,9 y 13,7 y el APA tipo proliferativa entre 2,5 y 8,9 (Tabla 3; Tabla 4).

GALPÓN	GRUPO A					
	9	10	11	12	13	TOTAL/ PROMEDIO
TOTAL DE ANIMALES FAENADOS	448	244	315	420	214	1641
TOTAL DE PULMONES INSPECCIONADOS	151	82	104	120	134	591
TOTAL DE PULMONES CON LPMND	130	74	78	85	92	459
PORCENTAJE PUMONES CON LPMND (%)	86	90,2	75	70,8	68,6	78,1
APA TOTAL	13,7	12,4	3,9	4,9	4,4	7,8
TOTAL DE PULMONES LPPC-NEP	111	72	76	81	86	426
PORCENTAJE PULMONES CON LPPC-NEP (%)	73,5	87,8	73	67,5	64,1	72
APA PROLIFERATIVA	7,9	8,9	3,2	2,7	2,5	5

Tabla 3. Cantidad de animales faenados y cantidad de pulmones inspeccionados, cantidad de pulmones con LPMND y con LPPC-NEP, porcentaje de LPMND y valores de APA total y proliferativa para subgrupos de animales del GRUPO A (Sin vacunar).

TIPO DE LESION		Galpón					Total/ Promedio
		9	10	11	12	13	
LPMND	%	86	90,2	75	70,8	68,6	78,1
	APA	13,7	12,4	3,9	4,9	4,4	7,8
LPPC-NEP	%	73,5	87,8	73	67,5	64,1	73,2
	APA	7,9	8,9	3,2	2,7	2,5	5

Tabla 4. Porcentaje de pulmones con lesión y APA de LPMND y LPPC-NEP de cerdos del GRUPO A (Sin vacunar).

Con respecto a los grupos vacunados, se observó diferencias entre los grupos de animales vacunados. Dentro del GRUPO B (una dosis de vacuna), el total de cerdos enviados a faena fue 2939, de los cuales se inspeccionaron pulmones de 775 animales. De estos animales, 139, 82, 137, 129, 96, 96 y 96 correspondían a los galpones 1, 2, 3, 4, 14, 15 y 16 respectivamente. El porcentaje de pulmones con LPMND estuvo entre 20,8 y 41,6% (promedio 31,5%) y el porcentaje de pulmones con LPPC-NEP entre 8,33 y 28,7% (promedio 21,1). El APA total estuvo entre 0,8 y 5,7 (promedio 6,6) y el APA tipo proliferativa entre 0,1 y 1 -promedio 0,6- (Tabla 5, Tabla 6).

Dentro del GRUPO C (dos dosis de vacuna), el total de cerdos enviados a faena fue 1456, de los cuales se inspeccionaron pulmones de 384 animales. De estos animales 372, 364, 360 y 360 correspondían a los galpones 5, 6, 7 y 8 respectivamente (Tabla 5). Finalmente, las diferencias dentro del GRUPO C el porcentaje de pulmones con LPMND estuvo entre 25 y 60,4% (promedio 40,1%) y el porcentaje de pulmones con LPPC-NEP estuvo entre 14,5 y 31,2% (promedio 22,3%). El APA total estuvo entre 2,1 y 4,5 (promedio 2,8) y el APA tipo proliferativa entre 0,3 y 1 (promedio 0,72) (Tabla 5, Tabla 7)

GALPÓN	GRUPO B								GRUPO C					TOTAL/ PROMEDIO
	1	2	3	4	14	15	16	Total/ Prom	5	6	7	8	Total/ Prom	
TOTAL DE ANIMALES FAENADOS	525	330	519	525	360	342	338	2939	372	364	360	360	1456	4395
TOTAL DE PULMONES INSPECCIONADOS	139	82	137	129	96	96	96	775	96	96	96	96	384	1159
TOTAL DE PULMONES CON LPMND	46	32	39	35	32	40	20	244	24	34	38	58	154	398
PORCENTAJE PULMONES CON LPMND (%)	33	39	28,4	27,1	33,3	41,6	20,8	31,88	25	35,4	39,5	60,4	40,1	34,86
APA TOTAL	0,8	2,6	2,7	4,4	5,3	5,7	3,8	3,6	2,2	2,1	2,3	4,5	2,8	3,2
TOTAL DE PULMONES CON LPPC-NEP	40	26	19	31	16	24	8	164	14	20	22	30	86	250
PORCENTAJE PULMONES CON LPPC-NEP (%)	28,7	31,7	13,8	24	16,6	25	8,3	21,1	14,5	20,8	22,9	31,2	22,3	21,7
APA PROLIFERATIVA	0,4	1,1	0,3	0,8	0,6	0,7	0,1	0,6	0,3	0,6	0,7	1	0,7	0,7

Tabla 5. Cantidad de animales faenados y cantidad de pulmones inspeccionados, cantidad de pulmones con LPMND Y LPPC-NEP, porcentaje de neumonías totales y proliferativas y valores de APA total y proliferativa para subgrupos de animales de los GRUPOS B y C (Vacunados con una o dos dosis respectivamente).

TIPO DE LESION		Galpón							Total/ Promedio
		1	2	3	4	14	15	16	
LPMND	%	33	39	28,4	27,1	33,3	41,6	20,8	31,5
	APA	0,8	2,6	2,7	4,4	5,3	5,7	3,8	3,6
LPPC-NEP	%	28,7	31,7	13,8	24	16,6	25	8,3	21,1
	APA	0,4	1,1	0,3	0,8	0,6	0,7	0,1	0,6

Tabla 6. Porcentaje de pulmones con lesión y APA de LPMND y LPPC-NEP de cerdos del GRUPO B (Una sola dosis de vacuna).

TIPO DE LESION		Galpón				Total/ Promedio
		5	6	7	8	
LPMND	%	25	35,4	39,5	60,4	40,1
	APA	2,2	2,1	2,3	4,5	2,8
LPPC-NEP	%	14,5	20,8	22,9	31,2	22,3
	APA	0,3	0,6	0,7	1	0,7

Tabla 7. Porcentaje de pulmones con lesión y APA de LPMND y LPPC-NEP de cerdos del GRUPO C (Dos dosis de vacuna).

Se observó diferencia estadísticamente significativa en la proporción de neumonías entre animales no vacunados (GRUPO A) y vacunados (GRUPO B y C) tanto para las LPMND (IC 95% 0,389-0,478 $p=0,0001$), como para las LPPC-NEP (IC 95% 0,461-0,550 $p=0,0001$). La comparación de las proporciones de neumonías entre animales vacunados con una dosis (GRUPO B) vs los vacunados con dos dosis (GRUPO C) fue estadísticamente significativa para las LPMND (IC 95% -0,147 -0,025 $p=0,0045$); no así para las LPPC-NEP (IC 95% -0,065 0,040 $p=0,68$).

También hubo diferencia estadísticamente significativa (IC95% 3,963-4,637, $p=0,0004$) en el APA de LPPC-NEP de animales no vacunados (GRUPO A) y vacunados (GRUPO B y C)- Tabla 8-. La diferencia no fue estadísticamente significativa en el APA de LPPC-NEP entre animales vacunados una (GRUPO B) y dos dosis (GRUPO C), (IC 95% 0,065- 0,135 $p=0,99$).

GRUPO	LPMND				LPPC-NEP			
	%		APA		%		APA	
A	459/591 ^a 77,6%		7,8 ^a		426/591 ^a 72		5 ^a	
B	Prom 398/1159 ^a	244/775 31,4	Prom 3,2 ^b	3,6 ^b	Prom 250/1159 ^b	164/775 ^b 21,1	Prom 0,7 ^b	0,6 ^b
C	35,8	154/384 40,1	3,2 ^b	2,8 ^b	21,7	86/384 ^b 21,7	0,7 ^b	0,7 ^b

Tabla 8. Porcentaje de pulmones con lesión y APA de LPMND y LPPC-NEP de cerdos de los tres grupos estudiados (y el promedio –prom- de los grupos B y C). Diferentes letras en superíndice indican diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$).

4.2. Índices productivos

En la Tabla N°9 se resumen los datos productivos e Sitio 3, de los tres Grupos en estudio.

Parámetros	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
Animales ingresados a sitio 3	6047	9395	5022
Edad de entrada a Sitio 3 en días	71	70	70
Peso de entrada Total	171216,5	261650	140195
Peso de Entrada Medio	28,31	27,85	27,92
Peso de salida Total	604600	991880	525001
Animales vendidos	5833	9121	4850
Peso de Salida Medio	103,65	108,75	108,25
Kg Ganados en la Etapa Total	433383,50	730230,00	384806,00
Kg Ganados en la Etapa Medio	75,34	80,90	80,33
Duración de la engorda en días	95,8	98	98
GDP en sitio 3	0,786	0,825	0,820
Días a la venta	166,8	168	168
Consumo alimento en el sector	1210200	2120000	1163000
Conversión de alimento en Sitio 3	2,792	2,90	3,02
Porcentaje Mortandad sobre ingreso al sector	2,02	1,31	1,41
Porcentaje Animales descarte	1,53	1,47	1,83

Tabla 9. Resumen de los datos productivos en Sitio 3

La media de GDP en Sitio 3 fue menor ($p= 0,0485$) en animales no vacunados (GRUPO A) respecto de los vacunados (GRUPOS B y C)- Tabla 10-. Mientras que la CA también fue menor ($p= 0,0002$) en animales no vacunados (GRUPO A) respecto de aquellos vacunados (GRUPOS B y C)- Tabla 10-. No hubo diferencia estadísticamente

significativa ni en GDP ni en CA ($p < 0,05$) entre animales vacunados con una sola dosis (GRUPO B) vs animales vacunados con dos dosis (GRUPO C)- Tabla 10-.

GRUPO	GDP		CA	
A	0,786 ^a		2,7 ^a	
B	0,825 ^b	Prom 0,8225 ^b	2,9 ^b	Prom 2,9 ^b
C	0,820 ^b		3,0 ^b	

Tabla 10. Valores medios de ganancia diaria de peso (GDP) y conversión alimenticia (CA) de los tres grupos estudiados (y el promedio –prom- de los grupos B y C) en Sitio 3. Diferentes letras en superíndice indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Con respecto a la correlación según los grupos de exposición, se observó una correlación negativa ($r = - 0.81233$, $P = 0.0948$) en el GRUPO A (control) entre GDP y la proporción de LPPC-NEP. Con respecto a los otros grupos (GRUPOS B y C) no se observó una correlación significativa entre GDP y LPMND, siendo para el grupo B $r = 0.43679$, $p = 0.2792$ y para el grupo C: $r = 0.56494$, $p = 0.4351$. En la comparación de las variables C.A y la proporción de LPPC-NEP, para el grupo A (control) se registró una correlación positiva y significativa $r = 0.90926$, $p = 0.0324$. Con respecto a los otros grupos no se observó una correlación significativa entre CA y prevalencia LPMND, siendo para el grupo B : $r = 0.10545$, $p = 0.8037$ y para el grupo C $r = 0.30299$, $p = 0.6971$.

4.3. Retorno económico

El retorno económico calculado entre los animales vacunados con una sola dosis (GRUPO B) y los animales no vacunados (GRUPO A) fue de \$ 51,39 a favor del Grupo B (Tabla 11), mientras que entre los animales vacunados con dos dosis (GRUPO C) y los animales no vacunados (GRUPO A) fue de \$ 16,40 a favor del Grupo C (Tabla 12). El

retorno económico calculado entre los animales vacunados con una sola dosis (GRUPO B) y los vacunados con dos dosis (GRUPO C) fue de \$ 47,38 a favor del Grupo B (Tabla 13).

Parámetros	GRUPO B	GRUPO A	Diferencia	Precio	Diferencia \$
Animales ingresados a sitio 3	9395	6047			
Edad de entrada a Sitio 3 en días	70	71			
Peso de Entrada Medio	27,85	28,39	0,54		
Peso de Salida Medio	108,75	103,65			
Kg Ganados en la Etapa	80,89	75,31	5,56	25,70 \$/Kg	142,89
Duración de la engorda en días	98	95,8			
Ganancia en el sector	0,825	0,786			
Días a la venta	168	166,8			
Conversión de alimento en Sitio 3	2,9	2,7			
Costo del alimento \$/Kg.	3,18	3,18			
Costo alimento p/ cerdo en Sitio 3 (\$)	743	659	-84		-84
Costos vacunas por dosis	7,5	0	-7,5	7,5	-7,5
RESULTADO					\$ 51,39

Tabla 11. Análisis de retorno económico entre los entre los animales vacunados con una sola dosis (GRUPO B) y los animales no vacunados (GRUPO A).

Parámetros	GRUPO C	GRUPO A	Diferencia	Precio	Diferencia \$
Animales ingresados a sitio 3	5022	6047			
Edad de entrada a Sitio 3 en días	70	71			
Peso de Entrada Medio	27,92	28,39			
Peso de Salida Medio	108,25	103,7			
Kg Ganados en la Etapa	80,33	75	5,580	25,70 \$/Kg	143,4
Duración de la engorda en días	98	95,8			
Ganancia en el sector	0,82	0,786			
Días a la venta	168	166,8			
Conversión de alimento en Sitio 3	3,02	2,7			
Costo del alimento \$/Kg.	3,18	3,18			
Costo alimento p/ cerdo en Sitio 3 (\$)	771	659	-112		-112
Costos vacunas por dosis	15	0	-15		-15
RESULTADO					\$16,40

Tabla 12. Análisis de retorno económico entre los entre los animales vacunados con dos dosis (GRUPO C) y los animales no vacunados (GRUPO A).

Parámetros	GRUPO B	GRUPO C	Diferencia	Precio	Diferencia \$
Animales ingresados a sitio 3	9395	5022			
Edad de entrada a Sitio 3 en días	70	71,25			
Peso de Entrada Medio	27,85	27,92			
Peso de Salida Medio	108,75	108,25			
Kg Ganados en la Etapa	80,90	80,33	0,56	\$/Kg 25,70	14,392
Duración de la engorda en días	98	99			
Ganancia en el sector	0,825	0,8127273			
Días a la venta	168	170,5			
Conversión de alimento en Sitio 3	2,9	3			
Costo del alimento \$/Kg.	3,18	3,18			
Costo alimento p/ cerdo en Sitio 3 (\$)	743	764	25.49		25.49
Costo vacuna por dosis	7,5	15	7,5	7,5	-,5
RESULTADO					\$ 43,78

Tabla 13. Análisis de retorno económico entre los entre los animales vacunados con una sola dosis (GRUPO B) y los animales vacunados con dos dosis (GRUPO C).

CAPITULO V

DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue comparar lesiones pulmonares macroscópica no diferenciada (LPMND) y aquellas lesiones pulmonares proliferativa craneoventrales compatibles con NEP (LPPC-NEP) en cerdos enviados a frigorífico, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia y retorno económico en cerdos no vacunados y cerdos vacunados contra *M. hyopneumoniae*. La temática es relevante ya que si bien existen otros factores para el control de la NEP como la mejora en las prácticas de manejo y condiciones de alojamiento de los animales y el uso de tratamiento antibiótico (Maes *et al.*, 2008), las vacunas ofrecen una buena alternativa de control.

A priori, las vacunas comerciales actualmente disponibles consisten mayormente de bacterinas (células enteras de *M. hyopneumoniae* inactivadas) con adyuvantes que mejoran la respuesta inmune, tanto humoral como celular. Tales vacunas presentan ciertas desventajas ya que no ofrecen protección total contra las lesiones pulmonares, ni impiden la colonización por parte del agente (Thacker *et al.*, 1998). Tampoco son capaces de minimizar la transmisión del microorganismo, aunque puede reducir el número de microorganismos en el tracto respiratorio (Meyns *et al.*, 2006). Sin embargo, muchos estudios han demostrado reducción de los síntomas clínicos, de las lesiones pulmonares, mejoras en la performance productiva de los cerdos y por ende mayores beneficios económicos para el productor (Maes *et al.*, 1998; 1999; 2008; Sibila *et al.*, 2007) al utilizar tales bacterinas. Estos estudios serán analizados más exhaustivamente más adelante.

El mecanismo por el cual las vacunas ejercen protección no es del todo claro. Después de la vacunación intra muscular (IM) hay una respuesta inmune humoral y celular (Thacker *et al.*, 1998) pero el rol protector de ambas respuestas no ha sido conclusivo. Si bien las bacterinas comerciales inducen una respuesta de anticuerpos específicos en suero, no indica necesariamente una respuesta inmune protectora. Como se dijo anteriormente, las principales ventajas de la vacunación de los cerdos contra *M. hyopneumoniae* es la reducción de los síntomas clínicos, de las lesiones pulmonares y mejoras en la performance productiva de los cerdos (Maes *et al.*, 1998; 1999; 2008; Sibila *et al.*, 2007).

5.1. Lesiones pulmonares

Las lesiones pulmonares compatibles con *M. hyopneumoniae* consisten en áreas consolidadas, de color grisáceo-violáceas localizadas de manera bilateral en los lóbulos apicales, cardíacos, accesorio y parte craneal de los diafragmáticos (Maes *et al.*, 2008). Existen varios métodos para puntuar las lesiones pulmonares que podrían utilizarse a nivel de granja, en frigorífico o en estudios experimentales. A nivel de granja, la necropsia y especial observación de los pulmones es recomendada cuando se observa una tos seca severa. En estas situaciones la presencia de lesiones puede indicar la presencia de *M. hyopneumoniae*, pero debido al hecho que otros agentes infecciosos pueden causar lesiones similares, son necesarias pruebas de laboratorio para confirmar el diagnóstico (Thacker & Minion, 2012; Sibila *et al.*, 2009).

La inspección y evaluación de lesiones pulmonares en frigorífico se utiliza comúnmente para estimar la prevalencia y la severidad de la NEP y su impacto en el precio de la carcasa, evaluación de factores de riesgo y eficacia de vacunas (Sibila *et al.*, 2009; Merialdi *et al.*, 2012).

El monitoreo en frigorífico puede ser útil también para la detección de la NEP en forma subclínica o la aparición de casos incipientes de NEP en animales en terminación, pero no provee información del curso de la enfermedad, ya que, por ejemplo, si la infección se da en las etapas de recría o desarrollo, las neumonías pueden resolverse, cuando los animales alcanzan la edad de faena (Noyes *et al.*, 1990; Sibila *et al.*, 2009).

Como se dijo con anterioridad, se ha estimado que deben examinarse por lo menos 30 pulmones, ya que este número de muestras es representativo de la prevalencia y la gravedad de la NEP en la pira (Davies *et al.*, 1995). Han sido propuestos varias escalas de lesiones pulmonares (Piffer, *et al.*, 1993; Hannan *et al.*, 1982; Morrison *et al.*, 1985; Straw *et al.*, 1986; Christensen *et al.*, 1999), cada una con su particularidad pero en definitiva todas utilizados para el mismo fin. En este sentido, un reciente estudio demostró una alta correlación entre los citados métodos para puntuar las lesiones pulmonares y observó también que la correlación más alta fue observada entre aquellos métodos que ponderan el área o el peso de cada lóbulo pulmonar (García-Morante *et al.*, 2016). En referencia a esto

cabe destacar que el método utilizado en el presente estudio (Piffer *et al.*, 1993) pondera las lesiones en cada lóbulo, considerando el peso de cada uno de ellos en relación al peso pulmonar total.

En general e independientemente del tratamiento, el porcentaje de pulmones con LPPC-NEP observado varió del 8,3% (correspondiente a la semana 16 del GRUPO B) al 87,5%, correspondiente a la semana 10 del GRUPO A (Tablas 3, 4, 5, 6, 7, y 8). Estos valores están dentro del rango de proporción de lesiones pulmonares observadas en otros estudios realizados anteriormente en nuestro país en granjas con una sanidad estándar, tanto en sistemas al aire libre, cuyas proporciones de pulmones con lesiones compatibles con NEP variaron del 40% al 56,7% (Ambroggi *et al.*, 1996; Riganti *et al.*, 1994; Linzitto *et al.*, 1992; Dolso *et al.*, 2000) como en sistemas en confinamiento, en donde se han informado prevalencias entre 58% y 87% aproximadamente (Perfumo *et al.*, 1994) con vacunación contra NEP.

El APA observado en el presente estudio fue de 0,7 para los cerdos vacunados independientemente de la cantidad de dosis y de 5 para los cerdos sin vacunar (Tablas 3, 4, 5, 6, 7, y 8). Este rango comprende valores similares a otros previamente informados en nuestro país, en un estudio que se realizó en tres granjas que utilizaban diferentes esquemas de vacunación, en los que se observaron valores de APA entre 1 y 1,57 (Bautista *et al.*, 2016), sin embargo son mucho menores a otros, informados en un estudio realizado en cuatro granjas con sistema confinado en donde se observó un APA promedio 30,8 (Perfumo *et al.* 1994).

Ahora bien, focalizando en el tratamiento de los animales, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre animales no vacunados (GRUPO A) y animales vacunados (GRUPOS B y C) en la proporción de LPMND, LPPC-NEP y APA. Aunque se reconoce que la protección inferida por la vacunación es en cierto punto incompleta ya que las mismas no previenen la colonización (Haesebrouck *et al.*, 2004), algunos estudios indican que las vacunas usadas actualmente pueden reducir el número de organismos en el tracto respiratorio (Meyns *et al.* 2006) y pueden hacer decrecer el nivel de infección en una piara (Sibila *et al.* 2007).

En el presente estudio, hubo una reducción en el porcentaje promedio LPPC-NEP de alrededor del 50% en animales vacunados con una o dos dosis respecto a los no

vacunados, así como también una reducción del 71,40% con respecto al valor promedio de APA (Tabla 8). En este sentido, existen en la literatura antecedentes controvertidos puesto que algunos trabajos han demostrado que la doble vacunación reduce el porcentaje de lesiones pulmonares en mayor medida que la vacunación con una sola dosis (Scheidt *et al.*, 1994; Maes *et al.*, 1999; Kyriakis *et al.*, 2001; Sibila *et al.*, 2007), mientras que otros afirman que la vacunación con una dosis es más efectiva en este sentido que la doble vacunación (Dawson *et al.*, 2002; Baccaro *et al.*, 2005).

En la literatura existe un sinnúmero de referencias que informan acerca de la reducción de lesiones pulmonares en cerdos vacunados contra *M. hyopneumoniae*. La reducción de los signos clínicos y de las lesiones en los pulmones en cerdos vacunados respecto a los no vacunados se ha observado desde hace tiempo en estudios que no consideraron las diferencias genéticas o de virulencia de las cepas vacunales como en nuestro caso (Scheidt *et al.*, 1994; Maes *et al.*, 1998; 1999; Siugzdaite *et al.*, 2002; Sibila *et al.*, 2007). A pesar de los avances en el conocimiento de la diversidad genética del agente y de la aceptación por la comunidad científica de cepas de alta y baja virulencia, estos factores no parecen, hasta el momento, tener implicancias prácticas respecto a la vacunación con cepas de diferente virulencia. En este sentido Strait *et al.* (2008) concluyeron que los cerdos que se vacunaron con una bacterina de *M. hyopneumoniae*, antes del desafío con una cepa virulenta de campo, tuvieron menos lesiones macroscópicas de neumonía.

Aparentemente, todos estos beneficios de la vacunación contra *M. hyopneumoniae* en referencia a la reducción de lesiones pulmonares, tendrían asidero en bases inmunológicas de la vacunación. En este sentido, un reciente estudio (Marchioro *et al.*, 2013) demostró que en cerdos vacunados hay inhibición de algunas citoquinas que son en definitiva las responsables de la respuesta inflamatoria exacerbada del huésped a la infección por *M. hyopneumoniae*. En el curso de la infección, después de la colonización de las ciliadas, el tejido conectivo perivascular y peribronquiolar es infiltrado por macrófagos, linfocitos B y linfocitos T. Esto se produce porque *M. hyopneumoniae* estimula a los macrófagos y los monocitos a secretar ciertas citoquinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (FNT- α). La IL-1 y el FNT- α son cofactores en la activación de linfocitos B y T, promueven su

proliferación y diferenciación a células efectoras y estimulan la actividad citocida de macrófagos y células *natural killers* (NK), mejoran el metabolismo de los polimorfonucleares, estimulan la hematopoyesis, aumentando el pool de células a ser estimuladas y atraídas químicamente hacia el lugar de la inflamación. Además, las células estimuladas por estas citocinas mejoran los niveles de expresión de receptores y producción de otras citocinas, quemocinas a y b y prostanglandinas. Además la IL-1 y el FNT- α producen necrosis y destrucción tisular. La IL-6 cumple funciones similares a la IL-1 y el FNT- α y además es un cofactor en la diferenciación y maduración de linfocitos B a células secretoras, mejora la expresión de receptores de IL-2. La IL-2 promueve la proliferación de linfocitos T y la hematopoyesis (Oliveira, 2004).

Además de este intrincado mecanismo, *M. hyopneumoniae* ejerce un efecto mitógeno no específico tanto en linfocitos de la sangre como de los linfonódulos bronquiales. Todo esto redonda un aumento en el reclutamiento de leucocitos al lugar de la inflamación y podría decirse que estos eventos inmunopatológicos juegan un rol importante en el desarrollo de las lesiones ya que aparentemente se producen más bien por la respuesta inmune del huésped que por la acción directa del *M. hyopneumoniae*. En el citado estudio (Marchioro *et al.*, 2013) se demostró que, en cerdos vacunados con una bacterina comercial, se presenta una inhibición de la IL-6 y un aumento de IL-10 e IL-12, todo esto en definitiva, inhibe la inflamación y por ende se reducen las lesiones pulmonares lo que explica este fenómeno en animales vacunados.

Por otro lado, y aunque no fue el objeto del presente estudio, la edad de la vacunación de los animales también es importante de mencionar. Para determinar el momento de la vacunación de los animales y diseñar el presente estudio, se realizó previamente un perfil serológico transversal en animales de 6, 20, 60, 80, 113 y 150 días de vida (ANEXO II). El esquema de vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae* que la granja tenía implementado era vacunación de las madres a los 90 días de gestación y a las cachorras pre-servicio con doble dosis a los 180 y 200 días de edad. En base a los resultados obtenidos (los anticuerpos maternos caen al 0% a los 80 días de vida y luego se observa una seroconversión entre los 113 y 150 días- ANEXO II) se decidió vacunar con una o dos dosis animales de 70 días de vida con una sola dosis (GRUPO B) y animales de 45 y 60 días con dos dosis (GRUPO C).

La efectividad de la vacunación contra *M. hyopneumoniae* depende entre otros factores, de la presión de infección del agente en los animales de la piara (Maes *et al.*, 1998, 1999). Considerando la seroconversión observada entre los 113 y los 150 días de vida y posteriormente las diferencias entre lesiones pulmonares y algunos índices productivos entre animales vacunados y no vacunados sugieren que la presión de infección era elevada y la vacunación de los animales redundó en un mejor control de la NEP.

Un aspecto muy controvertido es la interferencia de anticuerpos maternos con anticuerpos vacunales. En el presente estudio entre el 15 y 40% de los animales vacunados con una o dos dosis fueron seropositivos al momento de la vacunación (ANEXO II) y si bien no se realizó un posterior estudio serológico, hubo en los animales vacunados menores lesiones pulmonares como se mencionara anteriormente por lo que podría inferirse que no hubo interferencia entre los anticuerpos maternos y vacunales. Sin embargo, un estudio anterior informó que los lechones hijos de hembras vacunadas desarrollan bajos títulos de anticuerpos cuando son vacunados (Jayappa *et al.*, 2001). Dos experimentos compararon el grado de protección a la descarga experimental con *M. hyopneumoniae* cuando lechones con diferentes niveles de inmunidad materna eran vacunados (Thacker *et al.*, 2001, Jayappa *et al.*, 2001). En el primer estudio, no hubo diferencia en el grado de protección proporcionado por la vacuna entre cerdos hijos de hembras vacunadas y no vacunadas. Esas hembras habían sido vacunadas antes del parto, pero la piara era libre de *M. hyopneumoniae*. En el segundo estudio, los lechones de una piara infectada naturalmente con altos títulos de anticuerpos en suero al momento de la vacunación, no fueron bien protegidos de la descarga a las 16 semanas de edad, como los lechones vacunados más tardíamente, cuando los niveles de anticuerpos maternos eran bajos. Los autores concluyen que cuando se evalúa si los anticuerpos maternos pueden interferir en el desarrollo de la inmunidad activa, los niveles de anticuerpos de los lechones al momento de la vacunación pueden ser más importantes que la edad de los mismos. Hodgins *et al.* (2004) vacunaron cerdos con inmunidad pasiva a las 2, 3 o 4 semanas de vida y observaron que solo unos pocos animales con anticuerpos maternos respondieron a la vacunación.

Un estudio similar en la Argentina realizado por Carranza *et al.* (2004) coinciden con los trabajos anteriores al concluir que los animales vacunados en presencia de inmunidad pasiva no responden a la vacunación o lo hacen en forma insuficiente, pero

sugiere que la edad de los animales parecería influir en la respuesta inmune activa. También observan que en hijos de hembras sin vacunar la respuesta a la primera vacunación era mayor en animales de mayor edad. Estos resultados coinciden con los hallados por Rooke *et al.* (2003) quienes lo explican diciendo que los lechones recién nacidos tardan algunas semanas en madurar su sistema de inmunidad activa.

Otros estudios más recientes (Bandrick *et al.*, 2008; 2014) indican por el contrario, que los anticuerpos maternos estimularían la inmunidad celular en lechones hijos de madres vacunadas, vacunados en presencia de dichos anticuerpos.

Respecto al número de dosis de vacuna, no hubo diferencia estadísticamente significativa en la proporción de neumonías proliferativas ni en el APA entre animales vacunados con una (GRUPO B) o dos dosis (GRUPO C) – $p < 0,05$ (Tabla 8). En este sentido, vale la pena mencionar que existen varias vacunas disponibles comercialmente, tanto para administrar una sola dosis como doble dosis. Pragmáticamente, la doble vacunación es la práctica más frecuente, cuando la infección con *M. hyopneumoniae* ocurre en etapas tempranas de producción (Haesebrouck *et al.*, 2004). Comúnmente la primera dosis de vacuna se aplica entre los 7 y los 55 días de edad, de acuerdo a las recomendaciones de los laboratorios y a las prácticas de manejo de cada granja aunque existe un consenso de que al vacunar más tardíamente, se obtienen mejores resultados (Wallgren *et al.*, 2000; Jayappa *et al.*, 2001), lo que probablemente se deba a la maduración del sistema inmune del lechón mientras más edad éste tiene. La vacunación con una sola dosis es especialmente utilizada porque se requiere menos mano de obra y se puede aplicar más fácilmente en la práctica de manejo rutinaria de la granja. Sin embargo la efectividad de las vacunas de una sola dosis depende de la habilidad del personal que coloca la inyección, dado que se realiza una sola vez.

Diferentes estudios realizados acerca de la conveniencia de aplicar 1 o 2 dosis de vacuna, concluyen, al igual que en el presente estudio, que una dosis es suficiente ya que no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros de rendimiento medidos, incluyendo GDP, CA, ganancia de peso total, peso al final del ensayo, días de mercado, índices de tos y proporción de lesiones pulmonares (Roof, 2001, Baccaro *et al.*, 2006). Sin embargo, Sibila *et al.*, 2007, observaron que en determinadas condiciones, el uso

de protocolo de vacunación de 2 dosis fue más eficiente que el de una para reducir las lesiones compatibles con NEP en frigorífico.

Por último, del mismo modo que lo observado para las neumonías proliferativas, hubo diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en el porcentaje de neumonías totales y el valor de APA total entre animales no vacunados (GRUPO A) y vacunados (GRUPOS B y C). Esto es coherente con la metodología empleada puesto que las neumonías proliferativas están englobadas dentro de las neumonías totales. Además, aunque en el presente estudio no fueron considerados otros agentes causales de neumonías proliferativas y exudativas, existe evidencia de que la infección por *M. hyopneumoniae* puede predisponer a la infección por otros agentes causales de neumonía. En este sentido, se ha demostrado que la neumonía experimental por *M. hyopneumoniae* predispone a los cerdos a neumonía causada por *Pasteurella multocida* (Ciprian *et al.*, 1988; Amass *et al.*, 1994) y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Yagihashi *et al.* 1984). El virus del PRRS, exótico en nuestro país, en interacción con *M. hyopneumoniae* y otros agentes, como circovirus porcino tipo 2, virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA), virus de Influenza y coronavirus respiratorio se ha implicado en la aparición de una neumonía complicada, conocida como Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas (Desrosiers, 2001; Thacker *et al.*, 1999; Dufresne, 2001).

5.2. Índices productivos

El impacto de la enfermedad, radica no tanto por la mortalidad sino por la disminución en el aumento de la ganancia diaria de peso (GDP), ya que ha sido demostrado que por cada 10% de pulmón afectado existe una disminución en la ganancia diaria de peso de 37,4 grs/día. (Straw *et al.*, 1989).

Al igual que con las lesiones pulmonares en frigorífico, hubo diferencia estadísticamente significativa en la GDP entre animales no vacunados (GRUPO A) y vacunados (GRUPOS B y C) – Tabla 10. Al igual que con las lesiones pulmonares, existen varios antecedentes en la literatura en donde el mismo hecho ha sido observado, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Entre los resultados obtenidos después de vacunar contra *M. hyopneumoniae* se observa un mejoramiento en la GDP (2-8 %) y de la eficiencia de CA (2-5 %), menor tiempo para llegar al peso de faena, reducción de los signos clínicos y de las lesiones en los pulmones, y ocasionalmente, bajar la mortalidad y mejorar la calidad de la carcasa (Maes *et al.* 1998; 1999, Siugzdaite *et al.*, 2002). Wongnarkpet *et al.*, (1999) vacunaron cerdos de 14 y 28 días de edad contra *M. hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un establecimiento con antecedentes de presencia de ambos agentes y se siguieron los cerdos a frigorífico, observaron que hubo una mejora en el peso a faena y una disminución de lesiones de NEP entre los vacunados y los controles. Todos estos antecedentes sumados a los resultados obtenidos en el presente estudio sobre las diferencias de proporciones de lesiones pulmonares y valores de APA entre los grupos, en conjunto con el resultado de la correlación entre GDP y proporción de neumonías proliferativas (Correlación negativa, $r = -0,81233$) sugieren fuertemente que a mayor proporción de lesiones pulmonares, hay una menor GDP, lo que aparentemente es un hecho que se observa frecuentemente en este tipo de ensayos.

Sin embargo, a pesar de que hubo diferencia estadísticamente significativa en la CA entre vacunados y no vacunados (Tabla 10), presentaron menores valores de CA los animales no vacunados (2,7) que los vacunados (2,9) – Tabla 9-10- cuando lo esperable hubiese sido al revés. Estos parámetros productivos aparentemente presentan cierta controversia ya que mientras algunos informan diferencias significativas en los valores de GDP, CA, peso al final del ensayo y cantidad de días hasta llegar al peso de faena del mercado (Roof, 2001, Baccaro *et al.*, 2006) otros no han encontrado diferencias significativas en cuanto a GDP, peso a faena, días al mercado y CA (Morris *et al.* 2001).

. Debido a todas las causas que pueden influenciar en los parámetros productivos, como calidad y disponibilidad de alimento, método de pesaje de animales, presencia de otras infecciones bacterianas y/o virales, presencia de micotoxinas, etc, estudios experimentales bajo condiciones controladas deberían desarrollarse para dilucidar fehacientemente este fenómeno.

5.3. Retorno económico

Según los resultados obtenidos y analizados hasta el momento, se ha observado diferencias significativas entre la proporción de LPPC-NEP, los valores de GDP entre los animales no vacunados y los animales vacunados. En este escenario entonces, y bajo las condiciones del presente estudio los resultados del retorno económico (Tablas 11,12 y13) muestran el beneficio económico que implica la práctica de la vacunación, a pesar del costo de la bacterina utilizada. Para una dosis de vacuna el retorno económico fue de casi \$ 51,39(Tabla 11), mientras que para la doble vacunación, el retorno fue de \$ 16,40 (Tabla 12). El beneficio económico de la vacunación contra NEP observado en el presente estudio, coincide con resultados obtenidos en un estudio previo en el que se demostró que la vacunación mejoró la prevalencia de lesiones de neumonía y la gravedad de las lesiones de neumonía en un estudio previo (Maes *et al.*, 1999).

La decisión de la implementación de la práctica de la vacunación desde el punto de vista debe ser tomada en cuenta, así como otros factores inherentes a la enfermedad, como la presión de infección de la pira (Maes *et al.*, 1998; 1999). De hecho la vacunación no es recomendada en piaras libres de *M. hyopneumoniae* o en piaras con bajos niveles de infección (Maes *et al.*, 2008).

A pesar de que la comparación entre una y dos dosis arrojó como resultado un retorno económico de \$ 16,40 (Tabla 13), al no haber diferencias en cuanto a la reducción del porcentaje de neumonías proliferativas ni a los valores de APA entre animales vacunados con una o dos dosis no se justificaría económicamente dado que la práctica de vacunar dos veces a los animales requiere más mano de obra, mas insumos descartables y más tiempo que la vacunación con una sola, que fue igualmente efectiva.

A pesar de que la comparación entre GDP y CA entre animales vacunados y no vacunados no arrojó resultados taxativos, si lo hizo la comparación entre ambos grupos en cuanto al porcentaje de neumonías proliferativas, totales y valores de APA. Esto en conjunto con el mayor retorno económico obtenido entre animales no vacunados y los vacunados con una sola dosis y al no existir diferencias entre la aplicación de una o dos vacunas en ninguno de los parámetros medidos en el presente estudio sugieren que la vacunación con una sola dosis es suficiente para mitigar el efecto de la infección causada por *M. hyopneumoniae*, además de ser económicamente rentable.

En cada piara en particular, la infección por *M. hyopneumoniae* se presenta con diferente dinámica y el impacto de la enfermedad varía. Aunque los resultados obtenidos en el presente trabajo no pueden ser extrapolados a ninguna otra granja, es conveniente recalcar que un correcto diagnóstico serológico para determinar el momento más probable de infección y en base a ello implementar la vacunación, es una poderosa herramienta diagnóstica para el control de la NEP. Además, una correcta inspección, observación y cuantificación de las lesiones pulmonares en frigorífico permite una certera evaluación de los beneficios de la vacunación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexopoulos, C., Kritas, S.K., Papatsas, I., Papatsiros, V.G., Tassis, P.D. and Kyriakis, S.C. 2004. Efficacy of one and two shot vaccines for the control of enzootic pneumonia (EP) in a pig unit suffering from respiratory syndrome due to EP, PRRS and PMWS. Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress. Hamburg, Germany, June 27 to July 1, p 449.

Amass S.F, L.K. Clark; W.G. Van Alstine; T.L. Bowersock; D. A. Murphy; K.E. Knox; S.R. Albregts. 1994. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. JAVMA. 204; 102-107.

Ambrogi, A.; Andrada, M.; Sarradell, J.; Riart, G.; Yaciuk, R.; Pelliza, R. 1996. Lung etiopathological study at slaughterhouse of swine reared outdoor. Proc14th IPVS Congress. Bologna, Italy. 343.

Andrada, M.; Ambrogi, A. 1994. Estudio en matadero de pulmones de cerdos criados en sistemas al aire libre: Prevalencia y tipo de patologías. Memorias III Congreso Nacional de Producción Porcina. Rosario, Argentina. S24.

Andreasen, M.; Nielsen, J.P.; Baekbo, P.; Willeberg, P.; Bøtner, A. 2000. A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. J Prev Med. 45, 221-235.

Armstrong, C.H.; Sands-Freeman, L.; Freeman, M.J. 1987. Serological, pathological and cultural evaluations of swine infected experimentally with *Mycoplasma flocculare*. *Can J Vet Res* **51**,185–188.

Artiushin, S.; Minion, F.C. 1996. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. *Int J Syst Bacteriol.* 46, 324-328.

Baccaro, M.R., Hirose, F., Umehara, O., Gonçalves, L.C.B., Doto, D.S., Paixão, R., Shinya, L.T. and Moreno, A.M. (2006). Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. *The Veterinary journal*, 172, 526–31.

Bandrick, M., Pieters M, Pijoan C, Molitor TW. 2008 Passive transfer of maternal *Mycoplasma hyopneumoniae*-specific cellular immunity to piglets. *Clin Vaccine Immunol.* 15(3):540-3.

Bandrick M, Theis K, Molitor TW. 2014. Maternal immunity enhances *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination induced cell-mediated immune responses in piglets. *BMC Vet Res.* 10:124.

Baumeister, A.K.; Runge, M.; Ganter, M.; Feenstra, A.A.; Delbeck, F.; Kirchhoff, H. 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. *J Clin Microbiol.* 36, 1984-1988.

Bautista, S.; Tiranti, K.; Ferrero, S.; Ambroggi, A. y Tamiozzo P.J. 2016. Dinámica de infección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en granjas con diferentes esquemas de vacunación. *InVet.* 2016, 18 (1): 33-41.

Bereiter, M.; Young, T.F.; Joo, H.; Ross, R.F. 1990. Evaluation of the ELISA and comparison to the component fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Vet Microbiol.* 25, 177-192.

Blanchard, B.; Kobisch, M.; Bové, J.M.; Saillard, C. 1996. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Mol Cell Probes.* 10, 15-22.

Bolske, G.; Johansson, K. E.; Strandberg, M.L.; Bergstrom, K. 1990. Comparison of the cross-reaction to different *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen preparation in ELISA. Zentralbl Bakteriol Suppl. 20, 832-834.

Burch, D.G.S.; Webster, G.I.A; Morgan, M.; Mandonald, M.; Klein V. (2006). Comparative efficacy of tiamutin and lincospectin in the drinking water for the treatment of mixed enteric and respiratory infections in finishing pigs. Proc 19th IPVS Congress. Copenhagen, Denmark. p23.21. 343.

Calsamiglia, M.; Pijoan, C.; Trigo, A. 1999. Applications of a nested- polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J Vet Invest. 1, 246-251.

Calus, D.; Baele, M.; Meyns, T.; de Kruif, A.; Butaye, P.; Decostere, A.; Haesebrouck, F.; Maes D. 2007. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. Vet Microbiol. 120, 284-291.

Caron, J.; Ouardani, M.; Dea S. 2000. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinitis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. J Clin Microbiol. 38, 1390-1396.

Capuccio J, Perfumo C, Zielinski G. Tipos de vacunas y programas de vacunación en sanidad porcina. La vacunación en la prevención, el control y la erradicación de las enfermedades infecciosa de los animales. 2017. Cap. 13. Pag.272.

Carranza, A.; A. Ambrogi; R. Pelliza; G. Di cola. 2004. Efecto de los anticuerpos pasivos y de la edad de los lechones en la vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Revista de la asociación de porcicultura científica ANAPORC. 1 (8); 45-51.

Christensen, G.; Sørensen, V.; Mousing, J. 1999. Diseases of respiratory system. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine. Iowa University Press, Ames, Iowa. 913– 940.

Ciprian, A.; C. Pijoan; T. Cruz; J. Camacho; J. Tortora; G. Colmenares; R. Lopez-Revilla; M. de la Garza. 1988. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. Can J. Vet. Res. 52; 434-438.

Clark LK, Armstrong CH, Freeman MJ, Scheidt AB, Sands-Freeman L, Knox K. 1991. Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. Vet Med. 1991; 86: 543-550.

Davies, P.R.; Dial, G.D.; Marsh, W.E.; Bahnson, P.B. 1993. Feasibility of implementing a national swine slaughter monitoring system for the collection of health data from American swine herds. University of Minnesota.

Davies PR, Bahnson PB, Grass JJ, Marsh WE, Dial GD. 1995. Comparison of methods for measurement of enzootic pneumonia lesions in pigs. Am J Vet Res. 56, 9-14.

Dawson, A., Harvey, R.E., Thevasagayam, S.J., Sherington, J., Peters, A.R., 2002. Studies of the field efficacy and safety of a single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine for pigs. Vet. Rec. 151, 535–538.

Deneer, H.G.; Knight, I. 1994. Inhibition of polymerase chain reaction by mucolytic agents. *Clin Chem.* **40**, 171-172.

Desrosiers, R. 2001. A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. J. Swine Health. Prod. 1 (9-5); 233-237.

Dienes L.; Bullivant S, 1968. Morphology and reproductive processes of the L-forms of bacteria. II. Comparative study of L-forms and mycoplasma with the electron microscope. J. Bacteriology 95: 672-687

Dolso, I.; Pelliza, B.; Vissio, C.; Carranza, A.; Ambrogi, A.; Busso J. 2000. Lesiones neumónicas halladas en matadero y su asociación con sistemas de crianza de cerdos al aire libre y confinados. Memorias Congreso MERCOSUR de Producción Porcina. Bs.As. Argentina.SP-11.

Dubord X., Mausservey M., Puechberty L., Smith H., Rozzen. 2015 M. Eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a herd using aivlosin. Proc. 7th ESPHM. Pag 227.

Dufresne, L. 2001. Diagnosis and control of PRRS in PRDC. Proc. AASP Ann. Meet. Nashville, Tennessee; 491-496.

Erlanson K.R.; Evans, R.B.; Thacker, B.J.; Wegner, M.W.; Thacker E.L. 2005. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Swine Health Prod. 13, 198-203.

Etheridge, J.R.; Cottew, G.S.; Lloyd, L.C. 1979. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lesions in experimentally infected pigs. Aust Vet J. 55, 356-359.

Fablet, C.; Marois, C.; Kuntz-Simon, G.; Rose, N.; Dorenlor, V.; Eono, F.; Eveno, E.; Jolly, J.P.; Le Devendec, L.; Tocqueville, V.; Quéguiner, S.; Gorin, S.; Kobisch, M.; Madec, F. 2011. Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. Vet Microbiol. 147, 329-39.

Fagan, P.K., Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Chin, J. and Walker, M.J. 1996. Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (nrdF) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. Infection and Immunology 64, 1060-1064.

Fano, E.; Pijoan, C.; Dee, S.; Deen, J. 2007. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. *Can J Vet Res.* 71, 195-200.

Feld, N.C.; Qvist, P.; Ahrens, P.; Friis, N.F.; Meyling, A. 1992. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol.* 30, 35-46.

Frey, J.; Haldimann, A.; Nicolet, J. 1992. Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. *Int J Syst Bacteriol.* 42, 275–280.

Friis, N. 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. *Nord. Veterinaermed.* 27, 337-339.

Futo, S., Seto, Y., Mitsuse, S., Mori, Y., Suzuki, T. and Kawai, K. (1995). Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. *Journal of Bacteriology* 177, 1915-1917.

Garcia-Morante B, Segalés J, Fraile L, Pérez de Rozas A, Maiti H, Coll T, Sibila M. 2016. Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced Pneumonia using Different Lung Lesion Scoring Systems: a Comparative Review. *J Comp Pathol.* 54(2-3):125-34.

Gibb, P.A.; Wong S. 1998. Inhibition of PCR by agar from bacteriological transport media. *J Clin Microbiol.* 36, 275-276.

Goodwin , R.F.W. 1972. Isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* from the nasal cavities and lungs of pigs affected with enzootic pneumonia or exposed to this infection. *Res Vet Sci.* 13, 262-264.

Greiner, L., Connor, J.F. and Lowe, J.F. (2011). Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination. In: Proceedings of the 42nd Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians, Phoenix, Arizona, March 5 to 8, p 245-248.

Haesebrouck, F.; Pasmans, F.; Chiers, K.; Maes, D.; Ducatelle, R.; Decostere, A. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: What can we expect? *Vet Microbiol.* 100, 255–268.

Hannan PC, Bhogal BS, Fish JP. 1982. Tylosin tartrate and tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Research in Veterinary Science*, 33, 76-88.

Hannan, P., Windsor, G., de Jong, A., Schmeer, N., & Stegeman, M. (1997). Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 2037–2040.

Harasawa, R.; Koshimizu, K.; Takeda, O.; Uemori, T.; Asada, K.; Kato, I. 1991. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase Chain reaction. *Mol Cell Probes*. 5, 103-109.

Hodgins DC, Shewen PE, Dewey CE. 2004. Influence of age and maternal antibodies on antibody responses of neonatal piglets vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Swine Health Prod.* 12(1):10-16.

Jang J., Kim K., Park S., Um H., Coullier M., Hahn T. 2016. In vitro antibiotic susceptibility of field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinitis* from South Korea. *Proc. 24th IPVS.* 241.

Jayappa, H.; Davies, R.; Rapp-Gabrielson, V.; Wasmoen, T.; Thacker E. 2001. Evaluation of the efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin following immunization of young pigs in the presence of varying levels of maternal antibodies. *Proc AASV.* Nashville, Tennessee. 237-241.

Jensen, C.S., Ersbøll, A.K. and Nielsen, J.P. (2002). A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. *Preventive veterinary medicine* 54, 265–278.

Kazama, S.; Yahigashi. T.; Seto K. 1989. Preparation of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen for the enzyme-linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res.* 53, 176-181.

Keich, R.L.; Sabbadini, L.; Thacker, E.L.; Thacker, B.; Jolie, R.; Yancey Jr R.J.; McGavin D. 2001. Evaluation of the duration immunity of RespiSure-ONE following experimental challenge with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proc AASV.* Nashville, Tennessee. 136-137.

Kim, M.F., Heidari, M.B., Stull, S.J., McIntosh, M.A. and Wise, K.S. 1990. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. *Infection and Immunology* 58, 2637-2643.

Klein, U., de Jong, A., Moyaert, H., El Garch, F., Leon, R., Richard-Mazet, A., Ayling, R. (2017). Antimicrobial susceptibility monitoring of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma bovis* isolated in Europe. *Veterinary Microbiology*, 204, 188–193.

Kobayashi H, Kanazaki M, Kajiwara K. 2008. Macrolid, tiamulin and valnemulin susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains isolated in various parts of Japan, *Proc. 20th IPVS.* 187

Kobisch, M.; Blanchard, B.; Le potier M.F. 1993. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet Research.* 24, 67-77.

Kondo Y., Nakanishi N., Wakui Y., Richard-Mazet A., Kinoshita G., Jeannin P. 2016. Field efficacy of Zactran (gamitrommycin injectable solution) for the treatment of *Mycoplasma Hyopneuminea* for swine in Japan. *Proc. 24th IPVS.* 246.

Kokotovic, B.; Friis, N.F.; Jensen, J.S.; Ahrens, P. 1999. Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. *J Clin Microbiol.* 37, 3300-3307.

Kurth, K.T.; Hsu, T.; Snook, E.R.; Thacker, E.L.; Thacker, B.J.; Minion, F.C. 2002. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *J Vet Diagn Invest.* 14, 463-469.

Kyriakis, S.C., Alexopoulos, C., Vlemmas, J., Sarris, K., Lekkas, S., Koutsoviti-Papadopoulou, M., Saoulidis, K., 2001. Field study on the efficacy of two different vaccination schedules with HYORESP in a *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected commercial pig unit. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48, 675–684.

Le Carrou, J., Laurentie, M., Kobisch, M. and Gautier-Bouchardon, A.V. 2006. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the *parC* gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 1959–1966.

Li, Y.Z.; Ho, Y.P.; Chen, S.T.; Chiou, T.W.; Li, Z.S.; Shiuan, D. 2009. Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochemistry.* 74, 215-220.

Li, Y.Z.; Ho, Y.P.; Chen, S.T.; Shiuan, D. 2010. Proteomic analysis of the interactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine tracheal ciliated cells. *Appl Biochem Biotechnol.* 160, 2248-2255.

Linzitto, O.R.; Radman, N. 1992. Asociación de *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma hyopneumoniae* en neumonías porcinas. Memorias II congreso Nacional de Producción porcina. Rosario. Argentina.

Lillie, K., Ritzmann, M. and Heinritzi, K. 2004. Field study on the effect of the early single dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination (Stellamune® One) in a naturally infected

herd. In: Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress, Hamburg, Germany, June 27 to July 1, p. 414.

Liu, W.; Feng, Z.; Fang, L.; Zhou, Z.; Li, Q.; Li, S.; Luo, R.; Wang, L.; Chen, H.; Shao, G.; Xiao, S. 2011. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. J Bacteriol. 193, 1016-1017.

Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Lein, A., Vrijens, B. and de Kruif, A. (1998). The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. Journal of Veterinary Medicine. Serie B, 45, 495–505.

Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Vrijens, B., Verbeke, W., Viaene, J. and de Kruif, A. (1999). Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. Vaccine 17, 1024-1034.

Maes, D.; Verdonck, M.; Verdeke, W.; Viaene, J.; Kruif A. 2000. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Benefit to vaccination. Proc AASP. Indianapolis. Indiana. 327-333.

Maes, D., Verbeke, W., Vicca, J., Verdonck, M. and de Kruif, A. 2003. Benefit to cost of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds under Belgian market conditions from 1996 to 2000. Livestock Production Science 83, 85–93.

Maes, D.; Segales J.; Meyns T.; Sibila M.; Pieters M.; Haesebrouck F. 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. Vet Microbiol. 126, 297-309.

Maes D, Sibila M, Kuhnert P, Segalés J, Haesebrouck F, Pieters M. 2018- Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. Transbound Emerg Dis. 2018 May;65 Suppl 1:110-124.

Makhanon, M.M.; Thongkamkoon, P.; Neramitmansook, W.; Worarach, A. (2006). *In vitro* susceptibility test of *Mycoplasma hyorhinis* to antimicrobial agents. *Proc 19th IPVS Congress*. Copenhagen, Denmark. Abstract p.31.10. 2.443.

Marco E., Perdido J., Mora J., Martinez M., Roozen M. 2013. *Mycoplasma Hyopneumoniae* eradication in a 800 sow herd by partial depopulation and medication with tylvalosin (Aivlosin), tulathromycin (Draxxin) and tiamulin. *Proc.5th ESPHM*. 183.

March, R.; E. Torroella; J. Ferrer; D. Llopart. (2006). Comparative study of Doxycycline and tiamuline against Porcine pleuropneumonia. *Proc19th IPVS Congress*. Copenhagen, Denmark. p.16.06. 2, 240.

Marchioro, S.B., Simionatto, S., Galli, V., Conceição, F.R., Brum, C.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Dellagostin O.A. 2012. Production and characterization of recombinant transmembrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 155, 44-52.

Marchioro SB, Maes D, Flahou B, Pasmans F, Del Pozo Sacristán R, Vranckx K, Melkebeek V, Cox E, Wuyts N, Haesebrouck F. 2013. Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Vaccine*. 31(9):1305-11.

Marchioro SB, Sácristan Rdel P, Michiels A, Haesebrouck F, Conceição FR, Dellagostin OA, Maes D. 2014. Immune responses of a chimaeric protein vaccine containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens and LTB against experimental *M. hyopneumoniae* infection in pigs. *Vaccine*. 32(36):4689-94.

Mateusen, B.; Maes, D.; Hoflack, G.; Verdonck M.; de Kruif A. 2001. A comparative study of the preventive use of tilmicosin phosphate (pulmotil premix) and *Mycoplasma*

hyopneumoniae vaccination in a pig herd with chronic respiratory disease. Dis Vet Public health.48, 733-741.

Mattsson, J.; Bergstrom, K.; Wallgren, P.; Johansson K. 1995. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16SrRNA gene. J Clin Microbiol. 33, 893-897.

Mebus, C.A.; Underdahl, N.R. 1977. Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am J Vet Res. 38, 1249-1254.

Merialdi G, Dottori M, Bonilauri P, Luppi A, Gozio S, Pozzi P, Spaggiari B, Martelli P. 2011. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. Vet J. 193(1):234-9.

Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F. and Maes, D. (2006) Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. Vaccine 24, 7081-7086.

Minion, F.C.; Lefkowitz, E.J.; Madsen, M.L.; Cleary, B.J.; Swartzell, S.M.; Mahairas, G.G. 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. J Bacteriol. 186, 7123-7133.

Morris, C.R.; Gardner, I.A.; Hietala, S.K.; Carpenter, T.E. 1995. Enzootic pneumonia comparison of cough and lung lesions as predictors of weight gain in swine. Can J Vet Res. 59, 197-204.

Morris, J. 2001. Comparison of performance parameters of pigs vaccinated with Ingelvac® M. hyo 1-dose bacterin vs Respire® *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. AASV annual meeting. Nashville, Tennessee February 24-27, 35-38.

Morrison RB, Hilley HD, Leman AD, 1985. Comparison of methods for assessing the prevalence and extent of pneumonia in market weight Swine. *CanVet J.* 26, 381-384.

Mousing J, Christensen, G. 1993. Pathological lesions in the right and left porcine lung: evaluation of an alternative method for scoring pneumonic lesions based on right lung examination. *Acta Vet Scan.* 34, 151-158.

Nathues H, Spersger J, Rosengarten R, Kreienbrock L, Grosse Beilage E. 2012. Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. *Vet J.* 193(2):443-7.

Nicolet, J.; Paroz, P.; Bruggman S. 1980. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme immunosorbent assay. *Res Vet Sci.* 29, 305-309.

Noyes EP, Feeney DA, Pijoan C. 1990. Comparison of the effect of pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. *JAVMA* 197, 1025-1029.

Oliveira, S. 2004. Atypical immune responses to bacterial pathogens in pigs. 2004. Proc. Allen D. Leman Swine conference. 40- 44.

Opriesnig, T.; Thacker, E.; Halbur, P.G. 2006. Chlortetracycline is effective in reducing lesions in pigs coinfecting with *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine Circovirus Type 2. Proc 19th IPVS Congress. Copenhagen, Denmark. p.20.20. 2. 302

Pallares F., Lasa C., Roozen M., Ramis G .2014. Effects of Tylvalosin in drinking water on lung lesions, productive parameters and carcass quality on a farm affected by enzootic pneumonia. Proc. 6th ESPHM 2014. 233.

Pelliza, B.; Miguez, M.; Parsi, J.; Carranza, A.; Dolso, I.; Busso, J.; Yaciuk, R.; Ambrogi, A. 1998. Impacto productivo del *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos criados en

sistemas al aire libre. Memorias VI Congreso de prod. Porcina. Punta del este, Uruguay. S24.

Perfumo, C.; R. Sanguinetti; M. Risso; J. Aguirre; A. Armocida. 1994. Prevalencia en frigorífico de lesiones compatibles con Neumonía Enzoótica Porcina en animales provenientes de establecimientos de cría intensivo. Memorias III Congreso Nacional de Producción Porcina. Rosario. Argentina.S1.

Piffer, I. 1993. Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos. Documento 23. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Ministério de Agricultura e Reforma Agrária. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSA). Concórdia, SC, Brasil.

Pieters, M., Fano, E., Pijoan, C., & Dee, S. (2010). An experimental model to evaluate *Mycoplasma hyopneumoniae* transmission from asymptomatic carriers to unvaccinated and vaccinated sentinel pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 74, 157–160.

Pinto, P.M.; Chemale, G.; de Castro, L.A.; Costa, A.P.; Kich, J.D.; Vainstein, M.H.; Zaha, A.; Ferreira, H.B. 2007. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Vet Microbiol.* 121, 83-93.

Pinto, P.M.; Klein, C.S.; Zaha, A.; Ferreira, H.B. 2009. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci.* 7, e45.

Pointon, A.M.; Hueston, W.D.; Dial, G.D. 1990. Disease surveillance-Reducing the uncertainty of decision making. Proc. Allen D. Lemman Swine conference. 38-57.

Ramis G., Lasa C., Roozen M., Pallares F. 2014. Effects of Aivlosin on the reduction of *Mycoplasma Hyopneumoniae* from the respiratory tract of pigs from a farm affected by enzootic pneumonia. Proc. 6th ESPHM. 221.

Rappuoli, R. (2001). Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine* 19, 2688-2691.

Rautiainen, E.; Wallgren, P. 2001. Aspects of the Transmission of Protection against *Mycoplasma hyopneumoniae* from Sow to Offspring. *J Vet Med Series B.* 48, 55-65.

Razin, S.; Hayflick, L. 2010. Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. *Biologicals.* 38, 183-90.

Reznikov, M.; Blackmore, T.K.; Finlay-Jones, J.J.; Gordon, D.L. 1995. Comparison of nasopharyngeal aspirates and throat swabs specimens in a polymerase chain reaction-based test for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol.* 30, 2638-2643.

Riganti, J.; Sarradell, J.; Andrada, M.; Comba, E.; Larriestra, A.; Ambrogi A. 1994. Estudio en matadero de pulmones de cerdos criados en SAL: II. Agentes causales de neumonías. *Memorias del III Congreso Nacional de Producción Porcina.* Rosario. Argentina. S.25.

Roof, M., Burkhart, K. and Zuckermann, F.A. (2001). Evaluation of the immune response and efficacy of 1 and 2 dose commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. In: *Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*, Nashville, Tennessee, February 27 to 27, pp. 163-167.

Roof, M., Burkhart, K. and Zuckermann, F. (2002) Pig efficacy study comparing *Mycoplasma* vaccines used at one and 2 doses. In: *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress*, Ames, Iowa, June 2 to 5, p 395.

Rooke, J.A.; C. Carranca; I.M. Bland; A.G. Sinclair; M. Ewen; V.C. Bland; S.A. Edwards. 2003. Relationships between passive absorption of immunoglobulin G by the piglets and plasma concentrations of immunoglobulin G at weaning. Liv. Prod. Science; 81; 223-234.

Ross, R.F. 1999. Mycoplasmal diseases. In: Straw B.E; D'Allaire, S.; Mengeling, W.L.; Taylor D.J. Disease of Swine. 8th ed Ames, Iowa: Iowa state University Press; 495-509.

Ross, R.F.; Whittlestone, P. 1983. Recovery of, identification of, and serological response to porcine mycoplasmas. In: Methods in Mycoplasmaology (J.G. Tully and S. Razin, eds). Academic Press. New York. 2, 115-127.

Roozen M., Smits H., Biermann J., Eric van Esch. Eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a 2450 multiplier sow herd using tylvalosin (Aivlosin) without partial depop-repop. ESPHM 2013. Pag 185.

Ruiz, A.; Galina, L.; Pijoan, C. 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization of pigs sired by different boards. Can J Vet Res. 66; 79-85.

Scarselli, M., Giuliani, M.M., Adu-Bobie, J., Pizza, M. and Rappuoli, R. (2005). The impact of genomics on vaccine design. Trends Biotechnology 23, 84-91.

Scheidt, A.B., Mayrose, V.B., Van Alstine, W.G., Clark, L.K., Cline, T.R., Einstein, M.E., 1994. The effects of vaccinating pigs for mycoplasmal pneumonia in a swine herd affected by enzootic pneumonia. Swine Health Prod. 2, 7-11.

Sibila, M.; Calsamiglia, M.; Vidal, D.; Badiella, L.; Aldaz, A.; Jensen, J.C. 2004. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. Can J Vet Res. 68, 12-8.

Sibila M, Nofrarías M, López-Soria S, Segalés J, Valero O, Espinal A, Calsamiglia M. 2007. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and

associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet Microbiol.* 16;122(1-2):97-107.

Sibila, M., Nofrarías, M., López-Soria, S., Segalés, J., Valero, O., Espinal, A. and Calsamiglia, M. (2007b). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Veterinary microbiology* 122, 97–107.

Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segalés J. 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J.* 181(3):221-31.

Sitjar, M.; Noyes, E.; Moreso, J.M.; Simon, X.; Pijoan, C. 1996. Relationships among seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae*, lung lesions and production parameters in pigs. *J Swine Health Prod.*4, 273-277.

Siugzdaite J., K. Garlaite. 2002. Effect of Vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in a Pig Herd from Birth to Slaughter. *Acta Vet. Brno.* 71: 549-553

Sørensen, V.; Barford, K.; Feld, N.C.; Vraa-Andersen, L. 1993. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the surveillance of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Rev Sci Tech.* 12, 593-604.

Sørensen, V.; Ahrens, P.; Barfod, K.; Feenstra, A.A.; Feld, N.C.; Friis, N.F.; Bille-Hansen, V.; Jensen, N.E.; Pedersen, M.W. 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet Microbiol.* 54, 23-24.

Stakenborg, T., Vicca, J., Butaye, P., Maes, D., Minion, F.C., Peeters, J., de Kruif, A. and Haesebrouck, F. 2005. Characterization of In Vivo acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. *Microbial Drug Resistency* 11, 290-294.

Stärk, K.D.C.; Nicolet, J.; Frey J. 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *App Envirom Microbiol.* 64, 543-548.

Stärk, K.D.C. 2000. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine a literature review. *Vet J.* 159, 37-56.

Stipkovits, L.; Miller, D.; Glavits, R.; Fodor L.; Buch, D. (2001). Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* with various antibiotics. *Can J Vet Res.* 65, 213-222.

Stipkovits, L.; Laky, Z.; Abony, T.; Siugzdaite, J.; Szabo I. (2003). Reduction of economic losses caused by mycoplasma pneumonia of pigs by vaccination with Respisure® and by Tiamutin treatment. *Act Vet Hung.* 51, 259-271.

Strait EL, Rapp-Gabrielson VJ, Erickson BZ, 2008. Efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin in pigs challenged with two contemporary pathogenic isolates of M hyopneumoniae. *J Swine Health Prod.* 16(4):200-206.

Strasser, M., Frey, J., Bestetti, G., Kobisch, M. and Nicolet, J. 1991. Cloning and expression of a species-specific early immunogenic 36-kilodalton protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Infection and Immunology* 59, 1217-1222.

Straw, B.E.; Backstrom, L.; Leman, A.D. 1986. Examination of swine at slaughter. Part II. Finding at slaughter and their significance. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* 8, 106-112.

Straw, B.; V.K.Touvinen; M. Brigas-Poulin. 1989. Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. *JAVMA.*195; 1702-1706.

Switzer, W.P.; Ross, R.F. 1975. Mycoplasmal disease. *In: Disease of Swine*, 4th edition. Ed, H.W. Dune and A.D. Leman. Ames: Iowa State University Press. 741-764.

Tavio, M., Poveda, C., Assunç~ao, P., Ramirez, A., & Poveda, J. 2014. In vitro activity of tylvalosin against Spanish field strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Record*, 175, 539.

Taylor David. 2008. Role of mixed enteric infections- update on sensitivities of *Brachyspira* and *Mycoplasma* species in Europe in Denegard- Control and Eradication of Pneumoenteric Diseases in Swine. Satellite Symposium 21th IPVS. 4.

Thacker EL, Thacker BJ, Boettcher TB, 1998. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *J Swine Health Prod.* 6 (3):107-112.

Thacker, E.; P. Halbur; R.F. Ross; R. Thanawongnuwech; B.J. Thacker. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 37; 620-627.

Thacker, E.; Thacker, B.; Halbur, P.; Minion, F.; Young, T.; Erickson, B.; Thanawongnuwech R. 2000. The influence of maternally-derived antibodies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. Proc 16th IPVS Congress. Melbourne. Australia . 454.

Thacker, E.; Thacker, B.; Wolff, T. (2000b). Efficacy of Aureomycin chlortetracycline against experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* challenge. Proc 16th IPVS Congress. Melbourne. Australia. 457.

Thacker, E.; B. Thacker. 2001. Influence of maternally-derived antibodies on the efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. Proc. AASP Ann Meet. 513-516.

Thacker, E.; Thacker, B.; Halbur, P.; Shan, Y.; Bradford J.R. 2002. Reduction of PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* induced clinical disease by lincomycin. Proc 17th IPVS Congress. Ames. Iowa. USA. 483.

Thacker, E.L.; Nilubol, D.; Halbur, P.G.; Wolff, T.P. 2006. Efficacy of Aeuromycin Chlortetracycline (CTC) granulated premix in decreasing *Mycoplasma hyopneumoniae*-potentiated PRRSv pneumonia. Proc 19th IPVS Congress. Copenhagen, Denmark. p.14.04. 2.208.

Thacker, E. & Minion, C. Mycoplasmosis. In: ZIMMERMAN, J.J. et al. (eds.). 2012. Diseases of Swine, 10th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Publishing; 2012:779-797

Thongkamkoon, P.; Worarach, A; Kortheerakul, K.; Chansong N. (2002). *In vitro* susceptibility test of *Mycoplasma hyopneumoniae* to antimicrobial agents. Proc 17th IPVS Congress. Ames, Iowa. USA. 219.

Thongkamkoon, P, Neramitmansook W, Makhanon M, Klein U. 2008. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* during 2006-2007 in Thailand. 20th IPVS Durban. 460.

Thongkamkoon, P., Narongsak, W., Kobayashi, H., Pathanasophon, P., Kishima, M., & Yamamoto, K. (2013). In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates and occurrence of fluoroquinolone, macrolides and lincomycin resistance. Journal of Veterinary Medical Science, 75, 1067–1070.

Thrusfield, M.; Ortega, C.; de Blas, I.; Noordhuizen, J.P.; Frankena, K. 2001. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. Vet Rec. 148:567-572

Vasconcelos, A.T.; Ferreira, H.B.; Bizarro, C.V.; Bonatto, S.L.; Carvalho, M.O.; Pinto, P.M.; Almeida, D.F.; Almeida, L.G.; Almeida, R.; Alves-Filho, L.; Assunção, E.N.; Azevedo, V.A.; Bogo, M.R.; Brigido, M.M.; Brocchi, M.; Burity, H.A.; Camargo, A.A.; Camargo, S.S.; Carepo, M.S.; Carraro, D.M.; de Mattos Cascardo, J.C.; Castro, L.A.; Cavalcanti, G.; Chemale, G.; Collevatti, R.G.; Cunha, C.W.; Dallagiovanna, B.; Dambrós, B.P.; Dellagostin, O.A.; Falcão, C. Fantinatti-Garboggini, F.; Felipe, M.S.; Fiorentin, L.;

Franco, G.R.; Freitas, N.S.; Frías, D.; Grangeiro, T.B.; Grisard, E.C.; Guimarães, C.T.; Hungria, M.; Jardim, S.N.; Krieger, M.A.; Laurino, J.P.; Lima, L.F.; Lopes, M.I.; Loreto, E.L.; Madeira, H.M.; Manfio, G.P.; Maranhão A.Q.; Martinkovics, C.T.; Medeiros, S.R.; Moreira, M.A.; Neiva, M.; Ramalho-Neto, C.E.; Nicolás, M.F.; Oliveira, S.C.; Paixão, R.F.; Pedrosa, F.O.; Pena, S.D.; Pereira, M.; Pereira-Ferrari, L.; Piffer, I.; Pinto, L.S.; Potrich, D.P.; Salim, A.C.; Santos, F.R.; Schmitt, R.; Schneider, M.P.; Schrank, A.; Schrank, I.S.; Schuck, .A.; Seuanez, H.N.; Silva, D.W.; Silva, R.; Silva, S.C.; Soares, C.M.; Souza, K.R.; Souza, R.C.; Staats, C.C.; Steffens, .M.B; Teixeira, S.M.; Urmenyi, T.P.; Vainstein, M.H.,; Zuccherato, L.W.; Simpson, A.J.; Zaha, A. 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. J Bacteriol. 187, 5568-5577.

Verdin, E.; Saillard, C.; Labbé, A.; Bové, J.M.; Kobisch, M. 2000. A Nested-PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobroncholar washing from pigs. Vet Microbiol. 76, 31-40.

Vicca, J.; Stakenborg, T.; Maes, D.; Butaye, P.; Peeters, J.; de Kruif, A.; Haesebrouck, F. 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. Vet Microbiol. 97, 177-190.

Vicca J.; Stakenborg, T.; Maes, D.; Butaye, P.; Peeters, J.; de Kruif, A.; Haesebrouck, F. (2004). *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**, 4470-2.

Vicca, J., Maes, D., Stakenborg, T., Butaye, P., Minion, F., Peeters, J., de Kruif, A., Decostere, A. and Haesebrouck, F. (2007). Resistance mechanism against fluoroquinolones in *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Microbial Drug Resistance* 13, 166-170.

Villarreal, I., Meyns, T., Dewulf, J., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F. and Maes, D. (2011). The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *The Veterinary Journal* 188, 48-52.

Villarreal, I.; Maes, D.; Vranckx, K.; Calus, D.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F. 2011. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vacc.* 29, 1731-1735.

Vranckx, K., Maes, D., Marchioro, S.B., Villarreal, I., Chiers, K., Pasmans, F. and Haesebrouck, F. 2012. Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. *BMC Veterinary Research* 8, 24.

Wadowsky, R.M.; Laus, S.; Libert, T.; States, S.J.; Ehrlich, G.D. 1994. Inhibition of PCR-based assay for *Bordetella pertussis* by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a nasopharyngeal swab. *Clin Microbiol.* 32, 1054-1057.

Wallgren, P.; J. Vallgarda; M. Lindberg; L. Eliasson-Selling; T. Segall. 2000. The efficacy of different vaccination strategies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proc. 16th IPVS.* 461.

Whittlestone, P. 1979. Porcine Mycoplasmas. *In: the Mycoplasmas. Human and Animal Mycoplasmas. In pathogenic Mycoplasmas.* Ed. J.G. Whitcomb. New York: Academic Press. 2, 133-176.

Wongnarkpet S, Morris RS, Pfeiffer DU. 1999. Field efficacy of a combined use of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines in growing pigs. *Prev Vet Med.* . 39 (1):13-24.

Wu, C.C.; Shryock, T.; Long Lin, T; Fleck, M. (1997). Testing antimicrobial susceptibility against *Mycoplasma hyopneumoniae in vitro*. *J Swine Health Prod.* 5, 227-230.

Wu, C.C.; Wolff T. 2002. In vitro susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* to chlortetracycline. *Proc 17th IPVS congress.* Ames. Iowa. USA. 502.

Yagihashi, T.; T. Nunoya; T. Mitui; M. Tajima. 1984. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of *Haemophilus pleuropneumoniae* pneumonia in pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 46; 705-713.

Yeske, P.; Garloff, C.; Kolb, J.R. 2000. Using Ingelvac M. Hyo to control mycoplasmal pneumonia in a three site system. Proc 16th IPVS Congress. Melbourne, Australia. 468.

Yeske, P. (2001). Experiences with mycoplasma vaccinations: what to do if vaccination doesn't live up to expectations. In: Proceedings of the Allen D. Lemman Conference, University of Minnesota, USA, pp 108-110.

Zhang, Q., Young, T.F. and Ross, R.F. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infection and Immunology 63, 1013-1019.

Zielinski, G. 1992. Enfermedades respiratorias del cerdo. Importancia económica y control. Memorias II Congreso Nacional de Producción Porcina. Rosario, Argentina.

Zielinski, G. 1996. Evaluación de parámetros productivos en cerdos criados al aire libre vacunados contra neumonía enzootia. VII ALVEC. V Congreso nacional de Prod. Porcina. Rio Cuarto, Argentina. 155.

ANEXO I

Protocolo para la realización de las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos anti- *M. hyopneumoniae*

Para la detección de anticuerpos anti-*M. hyopneumoniae* se utilizó el kit comercial IDEXX HerdCheck® ELISA *Mycoplasma hyopneumoniae*. Las muestras fueron procesadas según las instrucciones del fabricante empleando una dilución 1:40 de las mismas. Como controles positivos y negativos se utilizaron los provistos por el kit para tal fin.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Todos los reactivos provistos por el kit fueron atemperados (temperatura ambiente entre 22 y 25°C) y agitados suavemente por movimientos circulares antes de su uso.

Se preparó luego de esto, la solución de lavado de en una proporción 1:10 en agua deionizada, utilizando por placa, 30 mL de solución de lavado en 270 mL de agua deionizada.

DILUCION DE LAS MUESTRAS

Todos los sueros procesados fueron descongelados, atemperados (temperatura ambiente entre 22 y 25°C) y agitados suavemente por inversión antes de ser diluidos en una proporción 1:40. La temperatura ambiente del laboratorio donde se realizó la prueba fue de 23°C. Los controles negativo y positivo NO fueron diluidos.

PROCEDIMIENTO

1. Se tomó la placa tapizada con antígeno y se anotaron las posiciones de las muestras en una planilla *ad-hoc*.
2. Se colocaron 100 μ l de control negativo en los pocillos A1 y A2.
3. Se colocaron 100 μ l de control positivo en los pocillos B1 y B2.
4. Se colocaron 100 μ l de cada una de las muestras diluidas en el correspondiente pocillo teniendo cuidado de no introducir demasiado el tip en el pocillo y de no salpicar a los pocillos vecinos.
5. Se incubó 30 min a temperatura ambiente.
6. Se vació el contenido de los pocillos invirtiendo la placa entera con un movimiento firme y decidido, pero suave sobre una piletta.
7. Se lavó cada pocillo, colocando 200 μ l de solución de lavado e invirtiendo la placa entera con un movimiento firme y decidido, pero suave sobre una piletta y escurriéndolo en cada lavado sobre papel absorbente. Este paso se repitió 3 veces (3 lavados)
8. Se colocaron 100 μ l de conjugado anti porcino-peroxidasa de rábano en cada pocillo.
9. Se incubó 30 min a temperatura ambiente.
10. Se vació el contenido de los pocillos invirtiendo la placa entera con un movimiento firme y decidido, pero suave sobre una piletta.
11. Se lavó cada pocillo, colocando 200 μ l de solución de lavado e invirtiendo la placa entera con un movimiento firme y decidido, pero suave sobre una piletta y escurriéndolo en cada lavado sobre papel absorbente. Este paso se repitió 3 veces (3 lavados)
12. Se colocaron 100 μ l de solución de sustrato TMB en cada pocillo correspondiente.
13. Se incubó 15 min a temperatura ambiente al abrigo de la luz.
14. Se colocaron 100 μ l de solución stop en cada pocillo correspondiente.
15. Se calibró el lector de ELISA Labsystem Multiskan con aire.
16. Se midieron y anotaron los valores usando un filtro de absorbancia de 650 nm-A(650).

LECTURA DEL TEST DE ELISA

Se tuvieron en cuenta las siguientes recomendaciones del fabricante:

- ✚ Que la diferencia entre la absorbancia promedio del control positivo y del control negativo fuera mayor o igual de 0,150.
- ✚ Que la absorbancia promedio del control negativo fuera menor o igual de 0,150.

Se calcularon los valores promedio de los controles positivos y negativos, el rango (valor de DO máximo – valor DO mínimo) y el coeficiente muestra/positivo (M/P) (Tabla 1).

Promedio control negativo	$=\frac{A(650) \text{ de pocillo A1} + A(650) \text{ de pocillo A2}}{2}$
Promedio control positivo	$=\frac{A(650) \text{ de pocillo B1} + A(650) \text{ de pocillo B2}}{2}$
Coeficiente Muestra/Control positivo (M/P)	$=\frac{A(650) \text{ de la Muestra} - \text{Promedio Control Negativo}}{\text{Promedio control positivo} - \text{Promedio control negativo}}$

Tabla 1. Cálculos realizados a todas las muestras que fueron procesadas por el kit comercial de ELISA IDEXX HerdCheck® para la detección de anticuerpos anti-*M. hyopneumoniae*

Todas las muestras con un coeficiente M/P igual o menor a 0,3 fue considerada NEGATIVA. Todas las muestras con un coeficiente M/P igual o mayor a 0,4 fue considerada POSITIVA. Las muestras con un coeficiente M/P entre 0,3 y 0,4 (sospechosas) fueron consideradas NEGATIVAS.

ANEXO II

Resultados del perfil serológico antes del comienzo del estudio.

Como se dijo en la sección Materiales y métodos, previo al comienzo del estudio y para determinar el momento óptimo de vacunación en el desarrollo del mismo se realizó un perfil serológico de la siguiente manera: Se realizó un muestreo transversal en un galpón, donde se tomaron muestras de sangre de 20 animales a los 6, 20, 60, 80, 113 y 150 días de vida. Todos los animales muestreados eran hijos de madres vacunadas contra *M. hyopneumoniae* de acuerdo al esquema previamente descrito. Una vez separado el suero, el mismo fue testado con el kit de ELISA de Herd Check *Mycoplasma hyopneumoniae* de Laboratorios IDEXX (ANEXO I). El esquema de vacunación contra *M. hyopneumoniae* que la granja tenía implementado, era vacunación de las madres a los 90 días de gestación y a las cachorras pre-servicio con doble dosis a los 180 y 200 días de edad. Se utilizaba la vacuna M+Pac®, del Laboratorio Schering Plough.

Los resultados observados en el perfil serológico muestran que la proporción de animales seropositivos que a los 6 días de edad es el 100%, va decayendo hasta los 80 días de vida, en que es 0% para luego aumentar al 30% entre el muestreo de los 113 días y los 150 días de vida (Gráfico 1).

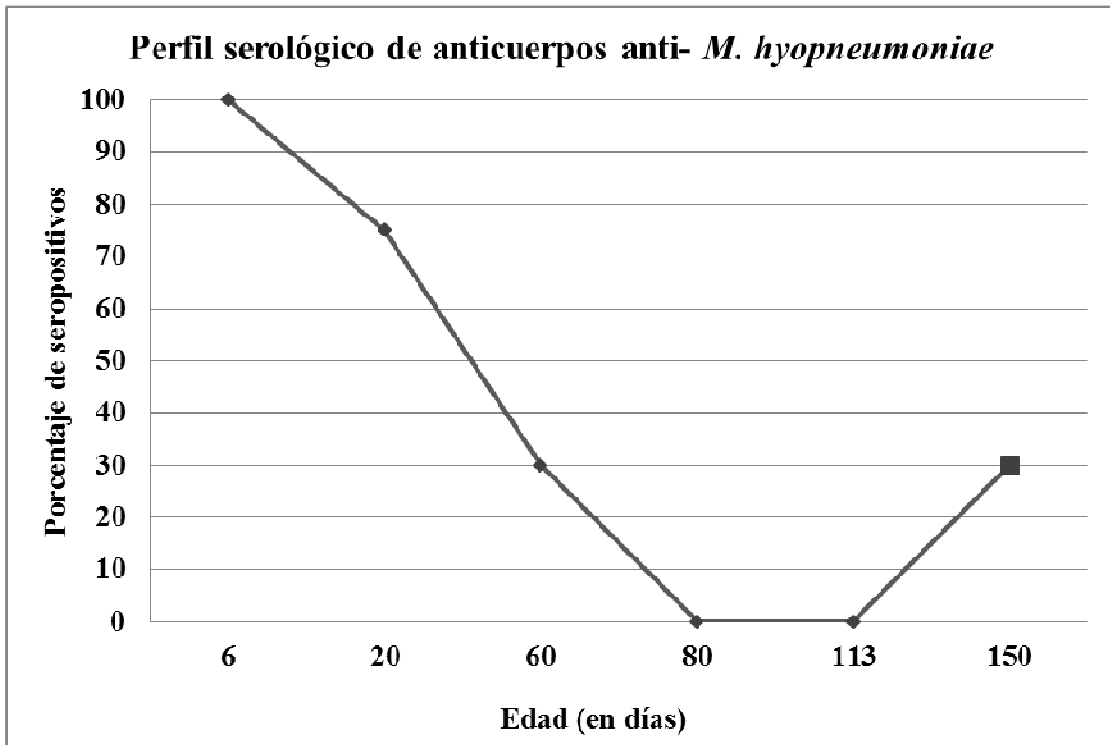


Gráfico 1. Porcentaje de animales seropositivos de acuerdo a la edad del muestreo realizado.