



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Trabajo Final presentado para optar al grado de Médico
Veterinario

Modalidad: Trabajo de Investigación

“Detección temprana de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos
de piaras endémicamente infectadas”

Degano, Facundo Ariel
DNI: 38.881.975

DIRECTOR: Pablo Jesús Tamiozzo

Río Cuarto-Córdoba.
Diciembre, 2018

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

Título del Trabajo Final: “Detección temprana de
Mycoplasma hyopneumoniae en cerdos de pjaras
endémicamente infectadas”

.

Autor: Degano, Facundo Ariel

DNI: 38881975

Director: Pablo Jesús Tamiozzo

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

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

Le Agradezco especialmente a Pablo Tamiozzo por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo y participar de sus proyectos, por sus enseñanzas, su tiempo, compromiso y dedicación.

A Nicolas Moiso y Jimena Seitz por su compañerismo y colaboración durante todas las etapas de este trabajo.

A todos los integrantes del grupo salud porcina por su colaboración y por hacerme sentir parte de su equipo.

A mis padres Ariel y Patricia, a mi hermana Ariana y a toda mi familia por darme la posibilidad de estudiar, por su cariño y apoyo incondicional y por ser un pilar fundamental en mi vida.

A mis amigos y compañeros de estudio por todos los buenos momentos compartidos y por ser una parte fundamental a lo largo de toda mi carrera universitaria.

A la Universidad Nacional de Rio Cuarto por los conocimientos que me ha brindado sin nada a cambio, los valores que me ha enseñado, por toda la gente que me ha permitido conocer y por ser algo más que una casa de estudios.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPOTESIS.....	5
OBJETIVOS	5
Objetivo general:.....	5
Objetivos específicos:	5
MATERIALES Y METODOS	6
Figura 1. Interior de un galpón de engorde de la Granja A.....	7
Figura 2. Interior de un galpón de engorde de la Granja B.....	7
Figura 3. Esquema de muestreo descripto.....	8
Figura 4. Obtención de los Hisopados Nasaes.....	9
Figura 5. Técnica empleada para obtener los hisopados laríngeos mediante la utilización de un abreboza.....	9
Procesamiento de las muestras:.....	10
Figura 6. Procedimiento de extracción de ADN mediante el Kit comercial Inbio- highway.....	10
Figura 7. En la imagen se observa el resultado de una nPCR mediante una corrida electroforética.	10
Relevamiento de signos clínicos:.....	11
Relevamiento de lesiones macroscópicas:	11
Figura 8. Áreas de consolidación pulmonar compatibles con N.E.P.	12
RESULTADOS.....	13
Tabla 1. Comparación de proporciones emparejadas para edades de granja A. 14	
Tabla 1.1 Comparación de proporciones emparejadas para edades de granja B.	15
Tabla 1.2. Comparación de proporciones emparejadas para edades de ambas granjas.	16
Gráfico 1. Proporciones de muestras positivas a la nested-PCR de hisopados nasales y laríngeos en cerdos de diferentes edades en la granja A.	17
Gráfico 2. Proporciones de muestras positivas a la nested-PCR de hisopados nasales y laríngeos en cerdos de diferentes edades en la granja B.....	17
Gráfico 3. Proporciones de muestras positivas a la nested-PCR de hisopados nasales y laríngeos en cerdos de diferentes edades en granjas A y B.....	18
Tabla 2. Número de animales que presentaron tos en los diferentes grupos de ambas granjas	18

Tabla 3. Proporción de Hisopados Nasales y Laríngeos positivos a la PCR a las 3 semanas de edad y proporción de animales con lesiones macroscópicas (%), área pulmonar afectada (APA) e índice de neumonía (IDN).....	19
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIÓN	23
BIBLIOGRAFÍA	24

RESUMEN

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina (NEP), una enfermedad respiratoria crónica de los cerdos. Este agente se transmite a través del contacto directo entre cerdos mediante aerosoles expulsados durante los accesos de tos. La detección temprana del agente es un desafío, puesto que mientras antes sea detectado, más eficaces serían las medidas de control de la enfermedad y menores las pérdidas productivas. En este sentido se ha informado recientemente que las muestras de hisopados laríngeos permitirían una detección más temprana respecto al hisopado nasal. Por ello, el objetivo del presente estudio fue comparar la proporción de PCR positivos en ambos tipos de muestras (Hisopado Nasal *vs* Hisopado Laríngeo) en cerdos de diferentes edades procedentes de 2 granjas endémicamente infectadas. Se realizó un estudio longitudinal en ambas granjas. En cada una de ellas, se siguieron 3 grupos de 20 animales cada uno, a los cuales se les colectó muestras de hisopado nasal y laríngeo a las 3, 6, 10, 16 y 22 semanas de edad. El ADN de las muestras fue procesado por nested-PCR para la detección del agente. Se determinaron las proporciones de hisopados nasales y laríngeos positivos a la PCR en cada granja y las diferencias de las proporciones entre los tipos de muestras fueron comparadas. Los resultados mostraron una mayor proporción de muestras de hisopado laríngeo positivas a las 6, 10, 16 y 22 semanas de edad. Se concluyó que el hisopado laríngeo es más sensible que el hisopado nasal para la detección de *M. hyopneumoniae* a partir de las 6 semanas de edad. A pesar de que este estudio se realizó en granjas con infección endémica, los resultados sugieren que se podrían usar hisopados laríngeos para la detección temprana del agente en granjas libres de *M. hyopneumoniae*, debido a su alta sensibilidad.

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is the causative agent of swine enzootic pneumonia (SEP), a chronic respiratory disease of pigs. This agent is transmitted through direct contact between pigs by aerosols expelled during coughing. Early detection of the agent is a challenge, since the earlier it is detected, the more effective the control measures for the disease and the lower the productive losses would be. In this regard, it has recently been reported that laryngeal swabs samples would allow an earlier detection regarding to nasal swab samples. Therefore, the objective of this study was to compare the proportion of PCR positive in both types of samples (nasal swabs vs laryngeal swabs) in pigs of different ages from 2 endemically infected farms. A longitudinal study was carried out in both farms. In each of them, 3 groups of 20 pigs each were followed, and sampled at 3, 6, 10, 16 and 22 weeks of age, collecting nasal and laryngeal swabs. Samples' DNA was processed by nested-PCR for the agent detection. The proportions of PCR positive nasal and laryngeal swabs in each farm were determined and the differences in the proportions between the types of samples were compared. The results showed a higher proportion of PCR positive laryngeal swab samples at 6, 10, 16 and 22 weeks of age. It was concluded that laryngeal swab was more sensitive than the nasal swab for *M. hyopneumoniae* detection from 6 weeks of age onwards. Although this study was conducted in farms with endemic infection, the results suggest that laryngeal swabs could be used for early detection of the agent in farms *M. hyopneumoniae*-free, due to its high sensitivity.

INTRODUCCIÓN

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina (NEP), una enfermedad respiratoria crónica de los cerdos (Thacker & Minion, 2012). Este agente se transmite a través del contacto directo entre cerdos mediante aerosoles expulsados durante los accesos de tos (Tacker & Minion, 2012). Esta transmisión de nariz a nariz y la consecuente circulación del patógeno pueden ocurrir en forma horizontal desde los cerdos infectados a los cerdos susceptibles o verticalmente desde la cerda a sus lechones (Thacker & Minion, 2012). El principal signo clínico de la NEP es la tos no productiva, de curso clínico crónico. Las lesiones macroscópicas consisten en áreas de consolidación pulmonar, de color violáceo-grisáceas, encontradas principalmente en los lóbulos pulmonares apicales, cardíacos, intermedio y parte anterior de los diafragmáticos, que resuelven entre las 12 y 14 semanas post-infección (Maes et al., 2009). La importancia de la enfermedad radica en las pérdidas económicas asociadas, ya que se ha demostrado que por cada 10% de pulmón afectado, hay una pérdida en la ganancia de peso diario de 37 grs aproximadamente (Straw, 1989). A pesar de ser una enfermedad muy estudiada, constituye aún un desafío por el fuerte impacto económico que causa, por su alta prevalencia en el mundo y en nuestro país y por las características particulares del agente causal en lo referente fundamentalmente a su patogenia y a la respuesta inmune (que modula) en el huésped.

El control de la enfermedad puede realizarse, como bien lo señalaron Maes et al. (2008) mediante la optimización de las prácticas de manejo, condiciones de alojamiento, uso de antibióticos y vacunación. En cuanto al diagnóstico, el aislamiento es la “prueba de oro”, pero debido a las exigencias nutricionales del microorganismo resulta poco sensible. Otras herramientas diagnósticas como la serología, el examen clínico, la inspección de lesiones pulmonares y distintos formatos de PCR están disponibles (Sibila et al., 2009) y son utilizados comúnmente para determinar su presencia en las piaras.

Aunque se ha propuesto que la detección del agente por PCR de muestras de hisopados nasales, no tiene un valor pre-clínico (Sibila et al. 2004), no existen demasiados antecedentes en la literatura. En ese sentido, ha sido demostrado que la prevalencia por PCR al destete puede ser utilizada como valor predictivo de las lesiones pulmonares macroscópicas en frigorífico, puesto que si supera el 10% en esa etapa, es muy probable que la severidad de las lesiones pulmonares sean mayores (Fano et al., 2007).

La detección temprana del agente es un desafío, puesto que mientras antes sea detectado, más eficaces serían las medidas de control de la enfermedad y menores las pérdidas productivas. En este sentido, se ha demostrado que la detección del agente en

nariz, tiene una buena correlación con la detección en tonsilas y en pulmón (Sibila et al., 2007). En un estudio longitudinal en una piara endémicamente infectada, se detectó una proporción mayor de animales PCR positivos en muestras de hisopados nasales entre las 6 y 9 semanas de edad en comparación con hisopados tonsilares y bronquiales; proporción que se invirtió a partir de las 12 semanas de edad y hasta que los animales fueron enviados a frigorífico, ya que hubo más positivos en muestras de hisopado bronquial en comparación a muestras de hisopados nasales y tonsilares (Sibila et al., 2007). Considerando estos hallazgos, las muestras de nariz permitirían la detección temprana del agente, sin embargo se ha informado recientemente que los hisopados laríngeos permitirían una detección más temprana respecto al hisopado nasal (Roos et al., 2016; García Morante et al., 2016). Los hisopos laríngeos serían un tipo de muestra altamente sensible para la detección por PCR de *M. hyopneumoniae* durante las primeras etapas de la infección (Pieters et al., 2017). Aunque la laringe no se considera la localización típica de la infección o colonización por *M. hyopneumoniae*, funciona como un sitio vestibular que conduce a las vías respiratorias inferiores. Un acceso de muestreo razonablemente bueno y la proximidad a las vías respiratorias inferiores, donde *M. hyopneumoniae* está en mayor cantidad, hacen de la laringe un sitio de muestreo preferido para la detección de este microorganismo (Pieters et al., 2017). Sin embargo debería comprobarse si estos resultados se repiten en condiciones de campo, ya que los mismos se obtuvieron a partir de cerdos inoculados de forma experimental.

Dada la importancia que radica conocer el estado de infección de los animales a una edad temprana para poder optimizar las medidas de control de *M. hyopneumoniae*, se propone comparar las proporciones de PCR positivos en ambas muestras (Hisopado Nasal Vs. Hisopado Laríngeo) en condiciones de campo.

HIPOTESIS

Mycoplasma hyopneumoniae es detectado en laringe más tempranamente que en cavidad nasal, en cerdos provenientes de piaras endémicamente infectadas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Detectar *M. hyopneumoniae* a partir de muestras de distintos sitios del tracto respiratorio de cerdos de diferentes edades provenientes de piaras endémicamente infectadas.

Objetivos específicos:

1) Detectar *M. hyopneumoniae* a partir de muestras de hisopado nasal e hisopado laríngeo de cerdos de distintas edades provenientes de piaras endémicamente infectadas.

2) Comparar la proporción de reacciones positivas en ambos tipos de muestras de cerdos de diferentes edades provenientes de piaras endémicamente infectadas.

3) Correlacionar la presencia del agente en nariz y/o laringe con la presencia de tos y lesiones pulmonares en cerdos de diferentes edades provenientes de piaras endémicamente infectadas.

MATERIALES Y METODOS

En todo el proyecto se trabajó con dos granjas endémicamente infectadas con *M. hyopneumoniae*.

La granja A era una granja de 2900 madres y de dos sitios (Figura 1). Las cerdas jóvenes se vacunaron contra *M. hyopneumoniae* con 3 dosis de M + PAC® (MSD Animal Health, Argentina) antes de la introducción al sitio I, a los 60, 145 y 165 días de edad y las cerdas a los 90 y 104 días de gestación. En cerdos se administraba una medicación estratégica en el alimento con 100 ppm de tiamulina (Denagard® 80% premezcla, ELANCO, Argentina) y 300 ppm de clortetraciclina (Diclortet® 15% premezcla, ELANCO, Argentina) durante 2 semanas a las 6 semanas de edad. La granja B era una granja de 1100 madres de tres sitios (Figura 2). En esta granja, las cerdas se vacunaron contra *M. hyopneumoniae* a los 180 y 200 días de edad y en cerdos, alrededor del destete, a las 3 semanas de edad (SPRINTVAC® MH, Merial, Argentina). En cerdos, la medicación estratégica en el alimento con antibióticos genéricos se administraba entre las 12 y 16 semanas de edad (100 ppm de tiamulina y 300 ppm de clortetraciclina) y entre las 16 y 20 semanas de edad de 50 ppm de tilosina.



Figura 1. Interior de un galpón de engorde de la Granja A



Figura 2. Interior de un galpón de engorde de la Granja B

Se realizó un estudio longitudinal siguiendo 3 grupos de animales que se solapaban entre sí (figura 3). En cada grupo, los animales seleccionados eran identificados con caravanas a las 3 semanas de edad. Se muestrearon cuatro hembras y cinco lechones de sus respectivas camadas. De ese modo, 20 animales (hijos de las cuatro hembras) fueron muestreados a las 3, 6, 10, 16 y 22 semanas de edad. Las muestras colectadas fueron hisopados nasales (Figura 4) y laríngeos (Figura 5). Como se puede ver en las imágenes siguientes, las muestras son sencillas y muy poco invasivas.

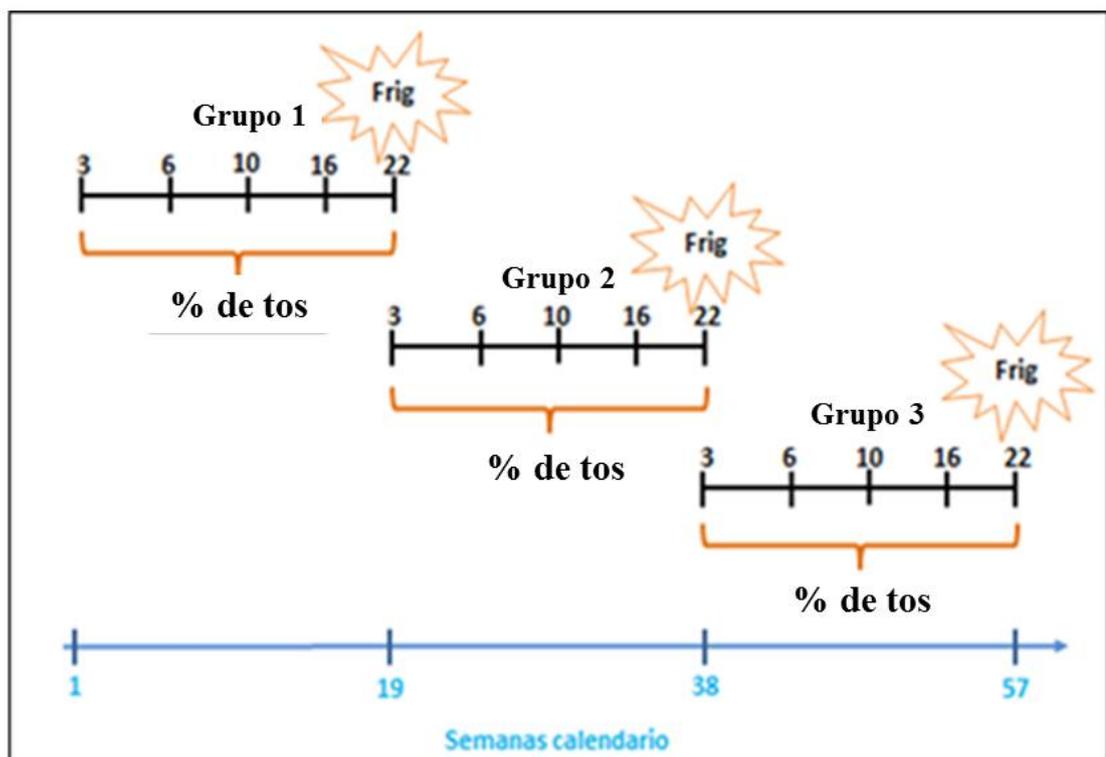


Figura 3. Esquema de muestreo descriptivo.



Figura 4. Obtención de los Hisopados Nasales.



Figura 5. Técnica empleada para obtener los hisopados laríngeos mediante la utilización de un abreboza.

Procesamiento de las muestras:

Las muestras (hisopados nasales y laríngeos) fueron procesadas de la siguiente manera: El ADN de las mismas fue extraído utilizando el kit comercial Inbio-highway (Figura 6).



Figura 6. Procedimiento de extracción de ADN mediante el Kit comercial Inbio-highway.

Las muestras fueron procesadas por la nPCR para la detección del gen del 16S rRNA de *M. hyopneumoniae* según Calsamiglia et al. (1999b) (Figura 7).

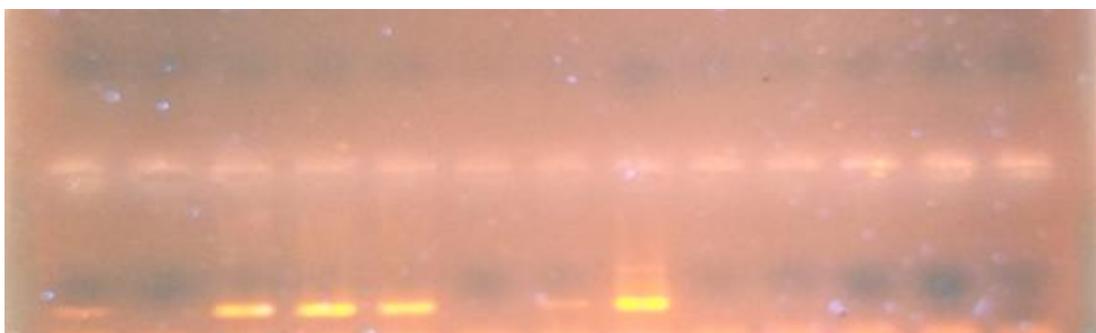


Figura 7. En la imagen se observa el resultado de una nPCR mediante una corrida electroforética.

Se determinaron las proporciones de nested-PCR positivos en hisopados nasales y laríngeos a las 3, 6, 10, 16 y 22 semanas de edad en cada granja. Las diferencias de las proporciones de muestras de hisopados nasales y laríngeos fueron comparados por medio de una tabla de contingencia 2x2 (χ^2). Se determinaron los intervalos de confianza para las diferencias de las proporciones.

Relevamiento de signos clínicos:

Además, en esas mismas visitas a la granja se inspeccionaron los corrales en donde estaban alojados los cerdos para medir el porcentaje de tos de la siguiente manera: 1) Se movilizaron los 20 animales por 30 seg. 2) Se contó la cantidad de animales con tos por un período de 3 min (1er registro) 3) Se esperó un minuto y 4) Se repitió la misma secuencia (2do registro). 5) Se calculó el porcentaje de cerdos con tos de la siguiente manera: número de cerdos con tos / número de cerdos muestreados x 100, en cada uno de los registros y luego se calculó el promedio de ambos registros.

Relevamiento de lesiones macroscópicas:

Los mismos animales fueron seguidos hasta frigorífico en donde se inspeccionaron sus pulmones en busca de lesiones compatibles con NEP, descritas como áreas de consolidación pulmonar, de color violáceo-grisáceas, encontradas principalmente en los lóbulos pulmonares apicales, cardíacos, intermedio y parte anterior de los diafragmáticos (Maes et al., 2009) -Figura 8-. Se calculó el área pulmonar afectada (APA) para lo cual se utilizó la metodología propuesta por Sobestiansky (2002): El porcentaje afectado (extensión de la lesión) de cada uno de los lóbulos pulmonares se multiplicó por su peso relativo obteniendo así el APA por lóbulo, luego se realizó la sumatoria de los valores de APA por lóbulo obteniendo el APA total. Se calculó el índice de neumonía (IDN) de acuerdo a lo previamente descrito por Sobestiansky (2002): según el APA de cada pulmón inspeccionado, se clasificó en siete categorías, del 0 al 6 del siguiente modo: APA de 0, categoría 0, APA de 0,1 a 11: categoría 1, APA de 11,1 a 21: categoría 2, APA de 21,1 a 31: categoría 3, APA del 31,1 al 41: categoría 4, APA del 41,1 al 51: categoría 5 y finalmente APA del 51,1 al 100: categoría 6. Luego se multiplicó la cantidad de pulmones por su correspondiente categoría lo que permitió obtener el índice por categoría y finalmente se dividió el índice por categoría sobre el número total de pulmones inspeccionados.

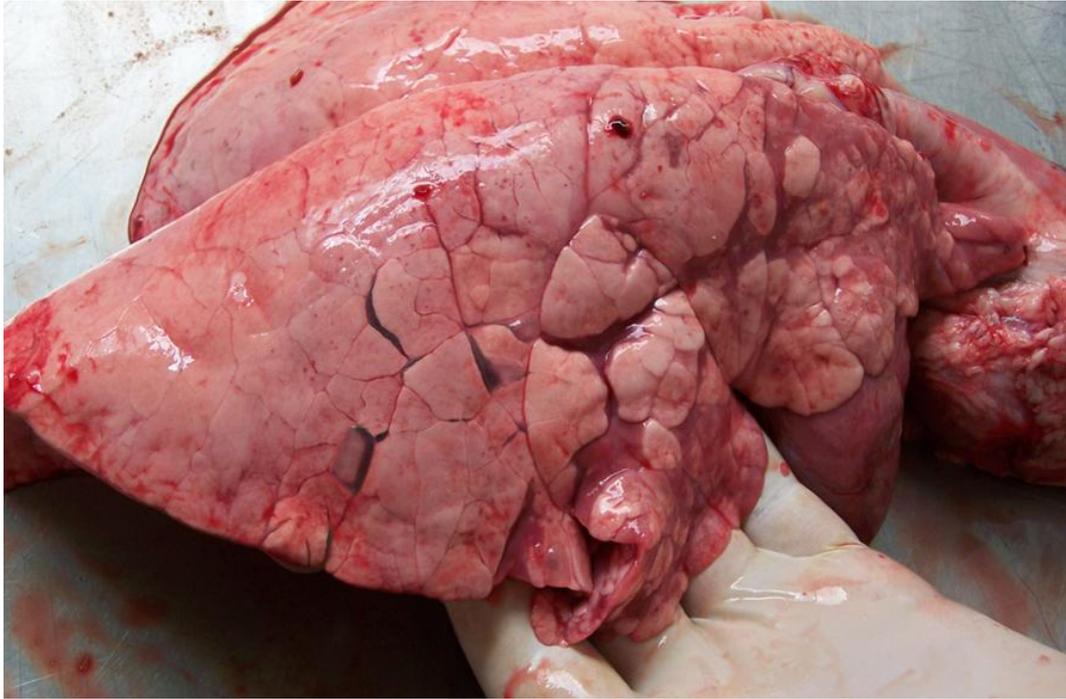


Figura 8. Áreas de consolidación pulmonar compatibles con N.E.P.

RESULTADOS

En la Granja A, se observó un mayor porcentaje de PCR positivos en los hisopados laríngeos respecto a hisopados nasales a las 3 (8,9%), 16 (7,2%) y 22 (21,8%) semanas de edad, siendo significativamente mayor la proporción de hisopados laríngeos ($p < 0,05$) solo a las 22 semanas. En el muestreo de 10 semanas, hubo una mayor proporción de PCR positivos en muestras nasales (1,8%) que en muestras de hisopados laríngeos. No hubo PCR positivos en hisopados nasales ni laríngeos a las 6 semanas de edad (Tabla 1, Grafico 1).

En la granja B, se detectó una mayor proporción de PCR positivos en los hisopados laríngeos respecto a los hisopados nasales a las 6 (18,3%), 10 (16,6%) y 16 (6,6%) semanas de edad, siendo significativamente mayor la proporción de hisopados laríngeos ($p < 0,05$) a las 6 y 10 semanas. En muestras de 3 y 22 semanas de edad, se obtuvo una mayor proporción de PCR positivos en muestras nasales con 10% y 5% respectivamente, en comparación con las muestras de hisopados laríngeos (Tabla 1.1, Grafico 2).

En ambas granjas *M. hyopneumoniae* se detectó en mayores proporciones en hisopados laríngeos respecto a hisopados nasales a las 6 (9,5%), 10 (7,8%), 16 (7,7%) y 22 (7,8%) semanas de edad, siendo significativamente mayor la proporción de hisopados laríngeos ($p < 0,05$) a las 6 y 16 semanas. A las 3 semanas de edad, no hubo diferencias significativas ni numéricas entre los resultados de la PCR de los hisopos nasales y laríngeos (Tabla 1.2, Grafico3).

Por otro lado, como puede observarse en la tabla 2, no se detectó la presencia de tos en ningún muestreo de la granja A, mientras que en la granja B solo se pudo detectar un animal a las 6 semanas de edad en el grupo 1 (5%) y en 3 animales de 22 semanas de edad en el grupo 2 (15%).

Con respecto a las lesiones macroscópicas, en la tabla 3 se puede observar que en el grupo 3 de la granja A y en el grupo 1 y 2 de la granja B hubo una proporción de hisopados nasales positivos a las 3 semanas de edad mayor al 10% (17,6%; 15% y 15%), el APA fue mayor (0,65; 0,48 y 0,71) al igual que la proporción de animales con lesiones macroscópicas (35%; 40%; 40%) y el IDN (0,47; 0,4 y 0,4). En el grupo 3 de la granja B hubo una proporción de hisopados nasales positivos a las 3 semanas de edad del 10%, el APA fue igual al grupo 2 de la granja A (0,37) y la proporción de animales con lesiones pulmonares macroscópicas fue menor al grupo 1 de la granja A (20% vs 25%) al igual que IDN (0,2 vs 0,25); en donde ambos grupos de la granja A (1 y 2) no hubo animales con hisopados nasales positivos. En cuanto a los hisopados laríngeos, en el grupo 3 de la granja A en donde se detectó una proporción de hisopados laríngeos positivos mayor al 10% (58%), el APA, la proporción de animales con lesiones macroscópica y el IDN fueron de 0,65, 35% y 0,47 respectivamente.

Tabla 1. Comparación de proporciones emparejadas para edades de granja A.

		3 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	3	6	9
	Negativo	0	46	46
	Total	3	52	55

8,9% (IC95% -1,96 - 12,4). p= 0,12

		16 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	1	5	6
	Negativo	0	49	49
	Total	1	54	55

7,21% (IC95% -3,08 - 10,08). p= 0,21

		6 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	No hubo Positivos		
	Negativo			
	Total			

		22 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	18	18	36
	Negativo	6	13	19
	Total	24	31	55

21,8% (IC95% 5,34 - 38,29). p=0,024

		10 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	0	3	3
	Negativo	4	48	52
	Total	4	51	55

1,81% (IC95% -10,2 - 8,04). p=1

Tabla 1.1 Comparación de proporciones emparejadas para edades de granja B.

		3 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	1	1	2
	Negativo	7	51	58
	Total	8	52	60

-10% (IC95% -13,4 - 0,77). p= 0,07

		16 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	5	5	10
	Negativo	0	50	50
	Total	5	55	60

6,66% (IC95% -2,82 - 9,9). p= 0,21

		6 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	4	12	16
	Negativo	1	43	44
	Total	5	55	60

18,3% (IC95% 6,05 - 21,58). p= 0,0034

		22 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	4	1	5
	Negativo	4	51	55
	Total	8	52	60

-5% (IC95% -8,25 - 3,6). p=0,3750

		10 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	2	11	13
	Negativo	1	46	47
	Total	3	57	60

16,6% (IC95% 4,60 - 19,9). p=0,0063

Tabla 1.2. Comparación de proporciones emparejadas para edades de ambas granjas.

		3 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	4	7	11
	Negativo	7	97	104
	Total	11	104	115

-0% (IC95% -6,56 - 6,56). p= 1

		16 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	6	10	16
	Negativo	0	99	99
	Total	6	109	115

7,75% (IC95% 1,65 - 9,43). p= 0,0117

		6 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	4	12	16
	Negativo	1	98	99
	Total	5	110	115

9,5% (IC95% 3,15 - 11,2). p= 0,0034

		22 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	23	19	42
	Negativo	10	63	73
	Total	33	82	115

7,82% (IC95% -1,240 - 16,89). p=0,137

		10 Semanas		
		HN		
		Positivo	Negativo	Total
HL	Positivo	2	14	16
	Negativo	5	94	99
	Total	7	108	115

7,82% (IC95% 0,39 - 13,49). p=0,063

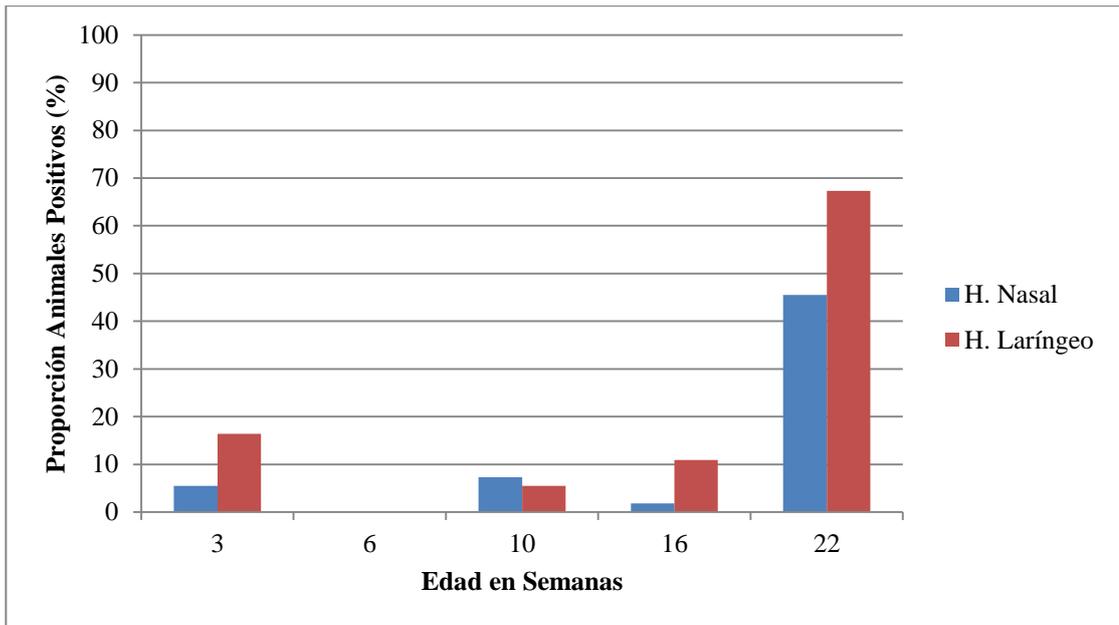


Gráfico 1. Proporciones de muestras positivas a la nested-PCR de hisopados nasales y laríngeos en cerdos de diferentes edades en la granja A.

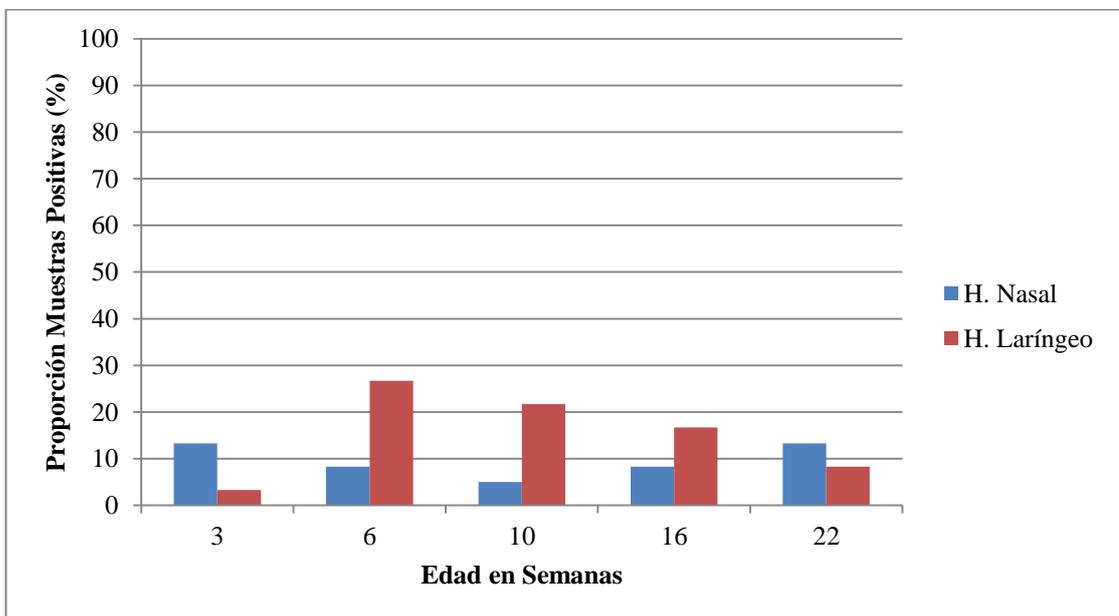


Gráfico 2. Proporciones de muestras positivas a la nested-PCR de hisopados nasales y laríngeos en cerdos de diferentes edades en la granja B.

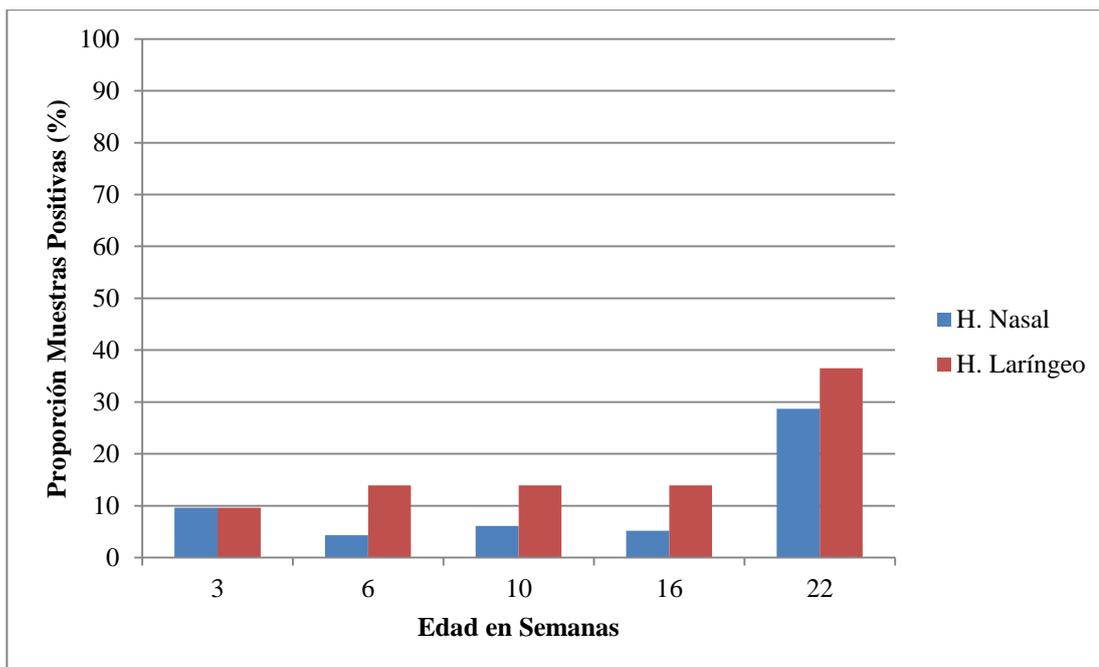


Gráfico 3. Proporciones de muestras positivas a la nested-PCR de hisopados nasales y laríngeos en cerdos de diferentes edades en granjas A y B.

Tabla 2. Número de animales que presentaron tos en los diferentes grupos de ambas granjas

Semanas	Granja A			Granja B		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
3	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	1/20 (5%)	-	-
10	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	3/20 (15%)	-

Tabla 3. Proporción de Hisopados Nasales y Laríngeos positivos a la PCR a las 3 semanas de edad y proporción de animales con lesiones macroscópicas (%), área pulmonar afectada (APA) e índice de neumonía (IDN).

Granja	Grupo	PCR 3 Semanas		Lesiones Macroscópicas		
		Nasal	Laríngeo	%	APA	IDN
A	1	0	0	25	0,23	0,25
	2	0	0	15	0,37	0,16
	3	17,6	58,8	35	0,65	0,47
B	1	15	0	40	0,48	0,4
	2	15	5	40	0,71	0,4
	3	10	5	20	0,37	0,2

DISCUSIÓN

Este estudio longitudinal se diseñó para comparar la detección por PCR de *M. hyopneumoniae* a partir de hisopados nasales y laríngeos en cerdos de diferentes edades de dos granjas con infección endémica a lo largo del tiempo.

El patrón de detección de *M. hyopneumoniae* mediante PCR de hisopados nasales y laríngeos fue diferente en cada granja. Esto podría explicarse debido a la eliminación irregular e intermitente del microorganismo informado anteriormente (Fano et al., 2005; Pieters et al., 2009). Vale la pena señalar aquí que el estudio se realizó en diferentes sistemas en los que se implementaron medidas de control particulares contra el N.E.P. Por lo tanto, en la granja A, no se detectó *M. hyopneumoniae* en el muestreo de 6 semanas, coincidiendo con la medicación antibiótica en el alimento utilizada entre las 6 y 8 semanas de edad en este sistema. Sin embargo, en la Granja B, a pesar de la medicación en la alimentación, el agente se detectó en los grupos 2 y 3 a las 16 y 20 semanas de edad. Teniendo en cuenta que la PCR puede detectar bacterias vivas o no viables, se puede suponer que el tratamiento con antibióticos fue efectivo y que *M. hyopneumoniae* no viable son barridas por los cilios y el aparato mucociliar hasta que en la laringe y la cavidad nasal son detectables. Otros factores, como la incapacidad del tratamiento con antibióticos para eliminar *M. hyopneumoniae* del tracto respiratorio (Le Carrou et al., 2006), la resistencia a los antibióticos (Vicca et al., 2004; Thongkamkoon et al., 2013) o la diferente eficacia entre los antibióticos de marca y genéricos (Gauzit y Lakdhari, 2012) pueden explicar estos resultados; sin embargo, este no es el enfoque de este estudio.

A pesar de tal diferencia en los patrones de detección, los resultados mostraron que el hisopado laríngeo es más sensible que el hisopado nasal para la detección de *M. hyopneumoniae*, a partir de las 6 semanas de edad. La falta de diferencia estadística en los lechones de 3 semanas de edad obtenidos en la Granja A y la mayor proporción de hisopados nasales con PCR positiva en la Granja B, indica que los hisopados laríngeos no son una muestra adecuada para detectar *M. hyopneumoniae* en lechones al destete, de acuerdo con los resultados anteriores (Takeuti et al., 2017). Eso podría explicarse, como han observado otros autores, porque al destete, en lechones infectados naturalmente, *M. hyopneumoniae* no alcanza la laringe hasta que la proliferación en los pulmones y los bronquios es suficiente, siendo indetectable en etapas tempranas de la infección en la laringe (Takeuti et al. al., 2017).

El lugar óptimo de muestreo del tracto respiratorio para la detección temprana de la infección por *M. hyopneumoniae* en lechones alrededor del destete sigue siendo un tema controvertido. Existe evidencia de que el patógeno se puede detectar en lechones de hasta 1

semana de edad utilizando hisopos nasales (Sibila et al., 2007a). De hecho, los hisopos nasales se han utilizado ampliamente para la detección de *M. hyopneumoniae* en cerdos peri-destete (Ruiz et al., 2002; Fano et al., 2007; Sibila et al., 2007a, b, Tamiozzo 2011). Desafortunadamente, existen pocos antecedentes sobre la comparación de diferentes sitios del tracto respiratorio para la detección de *M. hyopneumoniae* en lechones jóvenes vivos en condiciones de campo. Por otro lado, un estudio reciente comparó el rendimiento de los hisopados nasales y el moco traqueobronquial para la detección de *M. hyopneumoniae* en lechones vivos, concluyendo que el moco traqueobronquial es una muestra más sensible para la detección de *M. hyopneumoniae* (Vangroenweghe et al., 2015a). En cuanto al conocimiento de los autores, no existen antecedentes en la literatura que comparen el rendimiento de los hisopados laríngeos y el material traqueobronquial para la detección de *M. hyopneumoniae* en lechones de destete.

La mayor proporción de muestras de hisopado laríngeo positivas para PCR a las 6, 10, 16 y 22 semanas de edad sugiere que, a medida que los cerdos envejecen, la infección por *M. hyopneumoniae* en el tracto respiratorio inferior prolifera y la carga del microorganismo aumenta hasta ser detectable por PCR. En este sentido, una limitación de este estudio fue no haber cuantificado la carga de *M. hyopneumoniae* a partir de muestras nasales y laríngeas; Sin embargo, la sensibilidad de la PCR anidada utilizada aquí (Calsamiglia et al., 1999) es similar a la PCR en tiempo real informada anteriormente (Marois et al., 2010; Fablet et al., 2010).

El uso de hisopos laríngeos para la detección de *M. hyopneumoniae* se ha informado en estudios experimentales (Roos et al., 2016; Garcia-Morante et al., 2016; Pieters et al., 2017). Sin embargo, en condiciones de campo, solo se ha informado en cerdas infectadas de forma natural (Takeuti et al., 2017), pero nunca en cerdos en crecimiento a diferentes edades. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que compara el rendimiento de muestras de hisopados nasales y laríngeos para detectar *M. hyopneumoniae* en cerdos de granjas con infección endémica a lo largo del tiempo.

Parece obvio que cuanto más profundo en el tracto respiratorio se toma la muestra, más probable es que se detecte el agente, principalmente debido a que *M. hyopneumoniae* afecta el tracto respiratorio inferior. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, debe haber un equilibrio entre la sensibilidad para detectar el agente del espécimen deseado, la invasividad y la facilidad para recolectar el espécimen en cerdos vivos en condiciones de campo.

A pesar de que este estudio se realizó en granjas con infección endémica, los resultados sugieren que se podrían usar hisopados laríngeos para la detección temprana del agente en granjas libres de *M. hyopneumoniae*. En este sentido, un estudio reciente describió la utilización de un hisopo traqueobronquial para confirmar la infección por *M.*

hyopneumoniae en una granja libre de patógenos específicos -SPF por sus siglas en inglés- (Vangroenweghe et al., 2018b); sin embargo, para sugerir el uso de la muestra menos invasiva y más sensible en este tipo de escenarios, se deben realizar más estudios que comparen los hisopos traqueobronquiales y laríngeos.

Debido a la nula y muy baja presencia de tos en la granja A y B respectivamente, no se pudo correlacionar los resultados obtenidos mediante hisopados nasales y laríngeos con este signo clínico. Esto se puede deber posiblemente a los planes de vacunación y a los esquemas de tratamiento antibiótico utilizados como medida de control en ambas granjas. Además ya se ha mencionado que la técnica de PCR no tiene valor preclínico (Sibila et al., 2004).

Respecto al valor predictivo de la PCR al destete, se observó que cuando la prevalencia por PCR de hisopado nasal a las 3 semanas de edad en el grupo 3 de la granja A y los grupos 1 y 2 de la granja B superó el 10%, la severidad de las lesiones pulmonares (determinado por el APA, proporción de animales con lesiones macroscópicas e IDN) fue mayor. Por lo tanto, podría utilizarse como valor predictivo de la severidad de la infección medido por las lesiones pulmonares macroscópicas en frigorífico como lo describió Fano et al., 2007. Sin embargo, en el presente estudio, no se tuvo en cuenta las diferencias entre las granjas (manejo, bioseguridad, tratamientos, profilaxis, etc.) lo cual podría modificar la presión de infección y las lesiones macroscópicas. Como se mencionó anteriormente el hisopo laríngeo es más sensible que el hisopo nasal para la detección de *M. hyopneumoniae* a partir de las 6 semanas de edad, por lo que no se podría utilizar como valor predictivo de la severidad de la infección al momento del destete.

CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones de este estudio, el uso de hisopados laríngeos permitió la detección de *M. hyopneumoniae* en mayores proporciones que el hisopo nasal en cerdos a partir de las 6 semanas de edad. Debido al hecho de que el hisopo laríngeo es una muestra mínimamente invasiva, fácil de recolectar y la mayor sensibilidad con respecto a los hisopos nasales más tradicionales, se deben realizar estudios adicionales para evaluar el papel de este tipo de muestra en diferentes escenarios en condiciones de campo.

BIBLIOGRAFÍA

Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. 1999. Applications of a nested- polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. Aplicaciones de un ensayo de reacción en cadena de polimerasa anidada para detectar *Mycoplasma hyopneumoniae* a partir de hisopos nasales. J Vet Diagnost Inv 1, 246-251.

Camacho P, Tamiozzo P, Parada J, Carranza A, Busso JJ, Di Cola, G, Ambrogi R, A. Ambrogi A. 2014. Dynamic of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection by clinimetry, PCR and ELISA. Dinámica de la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* por clinimetría, PCR y ELISA. Proc 23rd IPVS Congress, Cancún, Quintana Roo, México. (1): 473.

Fano E, Pijoan C, Dee S. 2005. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. Dinámica y persistencia de la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos. Can J Vet Res. 69(3):223-8.

Fano E, Pijoan C, Dee S, Deen J. 2007. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. Efecto de la colonización por *Mycoplasma hyopneumoniae* en el destete sobre la gravedad de la enfermedad en cerdos en crecimiento. Can J Vet Res.;71(3):195-200.

Garcia-Morante B, Segalés J, López-Soria S, Pérez de Rozas A, Maiti H, Coll T, Sibila M. 2016. Induction of mycoplasmal pneumonia in experimentally infected pigs by means of different inoculation routes. Inducción de neumonía micoplásmica en cerdos infectados experimentalmente mediante diferentes vías de inoculación. Vet Res. 47: 54.

Gauzit R, Lakdhari M. 2012. Generic antibiotic drugs: is effectiveness guaranteed? Antibióticos genéricos: ¿está garantizada la eficacia? Med Mal Infect. 2012 Apr;42(4):141-8. doi: 10.1016/j.medmal.2011.10.013.

Le Carrou J, Laurentie M, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. 2006. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the parC gene. Persistencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos infectados experimentalmente después del tratamiento con marbofloxacin y la detección de mutaciones en el gen parC. Antimicrob Agents Chemother. 50(6):1959-66.

Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. 2008. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. Control de infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos. Vet Microbiol. Jan 25;126(4):297-309. Epub 2007 Sep 22. Review.

Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. 2009. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. Control de las infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos. Vet Microbiol. 126 (4):297-309.

Makhanon M, Tummaruk P, Thongkamkoon P, Thanawongnuwech R, Prapasarakul N. 2011. Comparison of detection procedures of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae*, and *Mycoplasma hyorhinis* in lungs, tonsils, and synovial fluid of slaughtered pigs and their distributions in Thailand. Comparación de los procedimientos de detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis* en pulmones, amígdalas y líquido sinovial de cerdos sacrificados y sus distribuciones en Tailandia. Trop Anim Health Prod. 2012 Feb;44(2):313-8. doi: 10.1007/s11250-011-0022-z.

Marois C, Dory D, Fablet C, Madec F, Kobisch M. 2009. Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. Desarrollo de un ensayo de PCR TaqMan en tiempo real cuantitativo para la determinación de la dosis mínima de la cepa 116 de *Mycoplasma hyopneumoniae* necesaria para inducir neumonía en cerdos SPF. J Appl Microbiol. 2010 May;108(5):1523-33. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04556.x.

Nathues H, Spargser J, Rosengarten R, Kreienbrock L, Grosse Beilage E. 2012. Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. Valor del examen clínico en el diagnóstico de neumonía enzoótica en cerdos de engorde. Vet J. 193 (2): 443-447.

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. Estudio cronológico de la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*, seroconversión y lesiones pulmonares asociadas en cerdos vacunados y no vacunados. Vet Microbiol. 2007 May 16;122(1-2):97-107.

Roos LR, Fano E, Homwong N, Payne B, Pieters M. 2016. A model to investigate the optimal seeder-to-naïve ratio for successful natural *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt exposure prior to entering the breeding herd. Un modelo para investigar la relación óptima entre sembradora y ingenua para la exposición natural exitosa a *Mycoplasma hyopneumoniae* dorada antes de ingresar al hato de cría. Vet Microbiol. 29;184:51-8

Ruiz A, Galina L, Pijoan C. 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization of pigs sired by different boars. *Mycoplasma hyopneumoniae* colonización de cerdos engendrados por diferentes verracos. Can J Vet Res. 66(2):79-85.

Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segalés J. 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Perspectivas actuales sobre el diagnóstico y epidemiología de la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet J. 181 (3): 221-231.

Straw, B.; V.K.Touvinen; M. Brigas-Poulin. 1989. Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. Estimación del costo de la neumonía en hatos porcinos. JAVMA.195; 1702-1706.

Sobestiansky, J.; Matos, M.; Souza, C. Neumonía. Monitoreo de cerdos en mataderos. Jurij Sobestiansky (eds.). 2002. Goiás: Jurij Sobestiansky; 2002: 22-28.

Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Rosell C. 2004. Association between *Mycoplasma hyopneumoniae* at different respiratory sites and presence of histopathological lung lesions. Asociación entre *Mycoplasma hyopneumoniae* en diferentes sitios respiratorios y presencia de lesiones histopatológicas de pulmón. Vet Rec.155(2):57-8.

Tamiozzo, PJ , Pelliza, BR, Carranza, AI, & Ambrogi, A. 2011. Monitoramento da presença de *Mycoplasma hyopneumoniae* em granjas de suínos durante a implementação de programas de erradicação. Monitoramento de la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* en granjas de suínos durante una implementación de programas de erradicación. Ciência Rural, 41(4), 699-705. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011005000038>

Thacker E. & Minion C. 2012. Mycoplasmal diseases. Enfermedades micoplasmáticas. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, eds. Diseases of Swine, 9th ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK; 701-717.

Takeuti KL, de Barcellos DESN, de Lara AC, Kunrath CF, Pieters M. 2017. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. Detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdas naturales infectadas a lo largo del tiempo. Vet Microbiol. 2017 May;203:215-220. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.03.025.

Pieters M, Daniels J, Rovira A. 2017. Comparison of sample types and diagnostic methods for in vivo detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* during early stages of infection. Comparación de tipos de muestras y métodos de diagnóstico para la detección in vivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* durante las primeras etapas de la infección. Vet Microbiol. ;203:103-109.

Vangroenweghe F, Karriker L, Main R, Christianson E, Marsteller T, Hammen K, Bates J, Thomas P, Ellingson J, Harmon K, Abate S, Crawford K. 2015. Assessment of litter prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in preweaned piglets utilizing an antemortem tracheobronchial mucus collection technique and a real-time polymerase chain reaction assay. Evaluación de la prevalencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* en lechones predestetados utilizando una técnica de recolección de moco traqueobronquial antemortem y un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. J Vet Diagn Invest. 2015 Sep;27(5):606-10. doi: 10.1177/1040638715595062.

Vangroenweghe F, Willems E, Maláček J, Thas O, Maes D. 2018. Use of trachea-bronchial swab qPCR testing to confirm *Mycoplasma hyopneumoniae* seropositivity in an SPF breeding herd. Uso de pruebas de qPCR con frotis traqueal-bronquial para confirmar la seropositividad de *Mycoplasma hyopneumoniae* en un hato de cría SPF. Porcine Health Manag. 4:12. doi: 10.1186/s40813-018-0088-3.

Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F. 2004. In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. Susceptibilidades in vitro de aislados de campo de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 48(11):4470-2.