

# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Circovirus porcino 2 y *Mycoplasma hyopneumoniae*:  
estudios de seguridad y eficacia vacunal, y adaptación  
de futuras reproductoras

**D. Sebastián Figueras Gourgues**  
**2020**



# **AGRADECIMIENTOS**



## Agradecimientos

---

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento en primer lugar a los directores de esta tesis:

Dr. D. Iván Hernández Caravaca, por animarme a realizar esta tesis cuando un buen día le transmití mi pensamiento. Su capacidad de análisis de la información que se traduce en la generación de ideas genuinas y pioneras, queda bien patente en este manuscrito. Su esfuerzo por dotar a la ciencia de un aspecto práctico y aplicable a nivel de campo, hace que toda investigación cobre sentido. Le agradezco su pasión por todo lo que hace.

Dr. D. Francisco Alberto García Vázquez, por aceptar el reto de dirigir esta tesis cuando se lo propusimos con Iván. Su dilatada experiencia en la investigación científica, la publicación de prolijos manuscritos y la dirección de numerosas Tesis Doctorales, han contribuido de forma brillante en este trabajo. Le agradezco su ímpetu en la incesante búsqueda de la perfección.

A continuación, agradezco a Boehringer Ingelheim Animal Health España S.A.U. por aceptar el marco de colaboración Universidad-Empresa, mediante el cual esta Tesis Doctoral opta a la Mención Industrial. La transferencia de conocimiento entre las entidades investigadoras/docentes y las compañías privadas, es el eje sobre el cual gravitan la evolución y el futuro de nuestra sociedad. Esta empresa es plenamente consciente de la importancia que tiene la formación y el desarrollo de los profesionales que la conforman, y este trabajo es un ejemplo de ello. Quiero agradecer a Deyanira Vega por formalizar esta colaboración, haberme dado todas las facilidades y por el entusiasmo que derrocha. Igualmente, agradezco a mis compañeros y amigos asesores veterinarios, Iván, Víctor, Eugenio y Gloria por hacer que el trabajo en equipo sea un auténtico placer.

## Agradecimientos

---

Agradezco a todos los autores y coautores de las publicaciones de se han derivado de esta tesis y que han contribuido con su experiencia y conocimiento aportando un valor incalculable. Un agradecimiento especial a Lorenzo, Quim, Eduardo, Oliver, Ana, Elisa, Rebeca y Bea.

Agradecer también a Agroturia, S.A. por haberme dado la posibilidad, al terminar mi licenciatura, de desarrollarme como veterinario especialista en medicina y sanidad porcina. Una empresa compuesta por grandes profesionales de los que aprendí mucho. Un agradecimiento especial a Pascual, Pepe, Oscar, Rodrigo, Jorge, Juan Fran y Jose Manuel.

En el plano personal, agradezco a mis padres, Pepo y Nani por darme la vida, la educación y la formación académica, personal y deportiva, en definitiva, TODO. Son mi referencia vital. Como también lo son mi hermano Nico y mi hermana Ceci. Irremplazables, los mejores que se podría desear tener.

Mi familia política merece un agradecimiento muy especial por su cálida acogida hace ya unos pocos años y por hacerme sentir uno más. Gracias de corazón.

Agradezco a mis extraordinarios hijos Sebas y Lourdes por haberme hecho renacer. Si vivo es por ellos y por mi maravillosa mujer Laura quien me animó hace ya algún tiempo a realizar la tesis que hoy culmina. Por ella soy cada día mejor. Gracias a los tres por el tiempo que les tomé prestado durante la redacción de esta tesis y que les dedico con todo mi Amor.

*A Laura, Sebas y Lourdes,*





Al amparo del Real Decreto 1393/2007, de 29 de octubre, que regula los estudios de doctorado en España, esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo un convenio de colaboración entre la empresa Boehringer Ingelheim Animal Health España, S.A.U. y la Universidad de Murcia en el marco de una tesis industrial.



# ÍNDICE



<b>1. Resumen/Summary</b> .....	1
<b>2. Lista de abreviaturas</b> .....	19
<b>3. Introducción</b> .....	25
3.1. La importancia del sector porcino.....	27
3.2. Protocolos sanitarios generales y de prevención en ganadería porcina.....	30
3.3. Principales enfermedades del ganado porcino.....	32
3.3.1. La Circovirus porcina (PCV-2).....	32
3.3.2. La Neumonía Enzoótica ( <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> ) .....	43
3.4. Respuesta del organismo a la vacunación en la especie porcina.....	54
3.5. Referencias.....	62
<b>4. Hipótesis y Objetivos</b> .....	97
<b>5. Capítulos</b> .....	101
<b>Capítulo 1:</b> Efecto de los anticuerpos de origen materno contra el circovirus porcino 2 (PCV-2) sobre el rendimiento y la viremia de PCV-2 en lechones vacunados en condiciones de campo.....	103
<b>Capítulo 2:</b> Evaluación del uso de la tecnología de nebulización para la exposición de cerdas nulíparas a <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (Mhyo) como una estrategia de aclimatación.....	139
<b>Capítulo 3:</b> Respuesta de fase aguda en suero inducida por diferentes protocolos de vacunación contra PCV-2 y Mhyo en lechones.....	167
<b>6. Discusión general</b> .....	191
<b>7. Conclusiones</b> .....	205
<b>8. Anexo: publicaciones derivadas de la tesis</b> .....	209



# **1. RESUMEN/SUMMARY**





El control eficaz y sostenido en el tiempo de las enfermedades sigue siendo el gran reto de los veterinarios especialistas en ganado porcino. Para ello, existen diferentes estrategias que se adaptan a la idiosincrasia de una industria que se encuentra en constante evolución. La industrialización del sector ha hecho que la epidemiología de diferentes patógenos se vea alterada y por tanto su control deba estar en constante revisión y mejora.

En este sentido la medicina preventiva veterinaria porcina descansa sobre tres pilares básicos, la prevención de la infección, maximización de la inmunidad y minimización de la exposición. Para generar una inmunidad protectora frente a los principales patógenos porcinos, la industria ha invertido muchos recursos en el diseño de vacunas, que contribuyan a la reducción del uso de antibióticos, mejora de índices técnicos y de bienestar de los animales. Estas vacunas contienen antígenos específicos o el patógeno vivo atenuado causante de la enfermedad teniendo como objetivo principal generar una respuesta inmunológica eficaz del animal, para minimizar el impacto de la infección cuando ésta acontezca. Minimizar la exposición a los patógenos es el objetivo de la implementación de diferentes medidas de manejo (limpieza y desinfección, estrategias de gestión de instalaciones en “todo dentro/todo fuera”, flujos unidireccionales, etc) diseñadas para reducir la presión de infección de los patógenos.

En la actualidad más del 70% de las vacunas en la especie porcina que se comercializan a nivel mundial son frente a la Cirovirosis porcina (Circovirus porcino 2, PCV-2), la Neumonía Enzoótica (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhyo), y el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS). El impacto económico de estas enfermedades es demasiado elevado como para poder prescindir de la vacunación de los

animales como medio eficaz de control. Los programas de vacunación frente a estas costosas enfermedades pueden ser muy diversos, siendo la vacunación de las reproductoras y los lechones la estrategia más completa para generar una inmunidad robusta de todo el rebaño.

Cuando la aplicación de las vacunas se realiza en momentos de la vida del lechón donde todavía están presentes los anticuerpos de origen maternal (AOM) estos podrían suponer una barrera frente a los antígenos vacunales. Ciertamente, el momento de vacunación de los animales frente a PCV-2 viene determinado por varios factores cruciales. Por un lado, conocer la epidemiología del PCV-2 es determinante pues el momento de infección de los lechones determinará la edad de vacunación. Por otro lado, es importante saber el tiempo que necesita la vacuna para conferir inmunidad protectora ante el desafío del patógeno de campo, esto es, el inicio de la inmunidad de la vacuna. Por último, y no menos importante en producción porcina, el momento óptimo de manipulación de los lechones para su vacunación (manejo) suele situarse generalmente entorno a la edad del destete. En este complejo escenario entra en juego la presencia muy habitual de los anticuerpos procedentes del calostro de la madre y transferidos en las primeras horas de vida del lechón. Estos anticuerpos pueden interferir en la eficacia de la vacunación según el nivel de los mismos. Esta circunstancia es la que se analiza en profundidad en el primero de los capítulos de la presente tesis.

Con respecto a la vacunación de los lechones frente a Mhyo está generalmente aceptado que ofrece buenos resultados a nivel clínico y productivo, sin embargo, la consistencia de estos oscila en gran medida en función de la prevalencia de este patógeno en los lechones al destete. Como citábamos anteriormente, determinados cambios de la

industria porcina han favorecido el cambio epidemiológico de algunos patógenos. La Neumonía Enzoótica, es un claro ejemplo de ello habida cuenta que, en los últimos años, las granjas productoras de hembras de reposición (granjas de multiplicación) han erradicado el patógeno para ofrecer animales indemnes de esta bacteria a las granjas de producción. Teniendo en cuenta que la mayoría de estas últimas son positivas a Mhyo, el efecto de introducir animales negativos en estas poblaciones ha tenido consecuencias directas en el incremento de la prevalencia de la infección en los lechones al destete dificultando así el control de la enfermedad. Las características intrínsecas de Mhyo, hacen de este patógeno habitual de las poblaciones porcinas, un enemigo difícil de controlar de forma sostenida en el tiempo. En concreto, la duración de la excreción de esta bacteria en los animales que se infectan puede resultar extraordinariamente larga (más de 200 días post-infección). El hecho de que las futuras cerdas reproductoras entradas en una explotación positiva, siendo ellas negativas o positivas, pero de infección tardía, conlleva en muchos casos la infección de sus lechones durante la fase de lactación. Por el contrario, las infecciones a edades tempranas de estas futuras reproductoras podrían evitar el contagio de su descendencia. En este sentido se han realizado diferentes estrategias para obtener una exposición homogénea y temprana de las futuras reproductoras con resultados inconsistentes. En el segundo de los capítulos se detalla un modelo de exposición a Mhyo que estaría dirigido al control de esta enfermedad de forma estable.

La estimulación de una inmunidad eficaz mediante el uso de vacunas debe conseguirse con los menores efectos negativos posibles que, en ocasiones, presentan estos productos sobre los animales, las comúnmente llamadas “reacciones adversas a

medicamentos". Tradicionalmente la evaluación de estas reacciones indeseables se realizaba mediante la medición de la temperatura rectal (TR) de los animales tras la vacunación o mediante la búsqueda de reacciones locales en el punto de inoculación. Esta información se encuentra habitualmente en las fichas técnicas o resúmenes de las características de los productos farmacéuticos. Existen además parámetros sanguíneos cuantificables como las proteínas de fase aguda (PFA) que reflejan la respuesta fisiológica a estos estímulos, siendo una manera indirecta de evaluación del bienestar de los animales, en los momentos posteriores a la vacunación. Estas proteínas marcadoras de estrés serán evaluadas en el tercer y último de los capítulos de esta tesis.

Por todo lo descrito anteriormente, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue el estudio integral de la eficacia y la seguridad de las vacunas de PCV-2 y Mhyo, así como la correcta adaptación a Mhyo de las futuras reproductoras, demostrando su influencia en los parámetros productivos y de bienestar del ganado porcino.

De este modo, el objetivo del capítulo 1 fue analizar el efecto de los niveles de AOM de PCV-2 sobre la eficacia de la vacuna en lechones vacunados a las tres semanas de edad con una vacuna comercial frente a esta enfermedad. El estudio se realizó analizando una base de datos con 6112 lechones de 4 regiones europeas diferentes. Los resultados mostraron que el uso de la vacuna fue capaz de disminuir la viremia PCV-2 calculada como área bajo la curva (ABC=  $60.29 \pm 3.73$  vs.  $198.27 \pm 6.14$ ), mejorar la ganancia media diaria (GMD=  $0.65 \pm 0.01$  kg/día vs.  $0.62 \pm 0.01$  kg/día) y reducir la mortalidad (7% vs. 11%) en los lechones vacunados en comparación con los no vacunados respectivamente. La diferencia global de GMD entre ambos grupos fue cercana a 30 g por día ( $p < 0.05$ ), también cuando se dividieron los lechones en función de sus niveles de anticuerpos de

origen materno (AOM) bajos y altos. Además, los animales con la GMD más alta se observaron en el grupo de lechones vacunados con títulos de anticuerpos altos o extremadamente altos (0.66 y 0.65 kg/día, respectivamente). Asimismo, la falta de correlación entre la GMD y AOM sugiere que no hubo interferencia de los anticuerpos maternos con la vacuna probada. Los animales vacunados crecieron más rápido en comparación con los animales del grupo control no vacunados, independientemente del nivel de anticuerpos maternos presentes en el momento de la vacunación. Los resultados del estudio demostraron que la inmunidad maternal contra PCV-2 transferida a través de la ingesta de calostro tiene un efecto protector contra esta infección viral. La vacuna utilizada (Ingelvac CircoFLEX®) fue efectiva cuando se aplicó a las tres semanas de edad y no se vio afectada por el nivel de AOM en el momento de la vacunación.

Si bien los anticuerpos maternos frente a PCV-2 transferidos de la madre a sus lechones pueden ser un desafío, en la eficacia de las vacunas de PCV-2, el mayor factor limitante de la eficacia de la vacunación frente a Mhyo en lechones, es la infección de los lechones con el patógeno procedente de sus madres durante el período de lactación, antes de que la vacuna pueda generar inmunidad. En este caso el objetivo a perseguir ha de ser el de vacunar lechones con una mínima colonización pulmonar de Mhyo en el momento de la vacunación, que se realiza generalmente entorno al destete.

En este sentido, el objetivo principal del capítulo 2 fue evaluar el uso de la tecnología de la nebulización (Neb) para una exposición eficaz a la bacteria Mhyo en cerdas nulíparas en condiciones de campo. Para lograr el objetivo, se diseñó un estudio de dos fases. La fase I consistió en la exposición a un homogeneizado pulmonar positivo a la bacteria (día de estudio (SD) 0) de 641 cerdas libres de Mhyo procedentes de cuatro lotes diferentes de

una unidad de cría de reproductoras (GDU). Los lotes 1 y 2 se expusieron por vía intratraqueal (IT) y se usaron como referencia para los lotes 3 y 4, que se expusieron a través de Neb. Se tomaron muestras de raspados traqueobronquiales (TBS) a los 14 y 28 días después de la exposición (SD14 y SD28, respectivamente) para evaluar el éxito de la infección por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rt-PCR) en muestras agrupadas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en términos de proporción de muestras de TBS positivas ni en la carga bacteriana (valor medio de Ct) entre los lotes expuestos por IT o por Neb en ningún punto del muestreo. A continuación, en la fase II del estudio, un total de 1160 hembras de reposición de la misma GDU perteneciente a otros tres lotes diferentes (lotes 5-7) fueron expuestas a Mhyo. En este caso, se recogieron TBS en SD14 y los resultados estuvieron en línea con los obtenidos en la fase I. Todas las muestras resultaron positivas a Mhyo por rt-PCR. La información generada en esta investigación consolida el uso de la nebulización como un método fiable de exposición a Mhyo en condiciones de campo. Esto implica una comprensión más amplia sobre cómo usar y asignar otras estrategias viables, que pudieran completar protocolos estándares para la aclimatación de cerdas nulíparas a Mhyo antes de ingresar como hembras reproductoras.

Pero si bien la eficacia de las vacunas es determinante en el control de las enfermedades generadas por los patógenos, no menos importante es que sean productos lo más seguros posible para los lechones.

En el capítulo 3, el objetivo del estudio fue comparar la seguridad de diferentes protocolos de vacunación utilizados contra el PCV-2 y Mhyo, estudiando dos proteínas de fase aguda, la haptoglobina (Hp) y la proteína C reactiva (CRP), y cambios en la TR.

Además, se analizó la posible influencia del día de vacunación y la raza. En el primer experimento, se vacunaron 40 lechones híbridos comerciales el día del destete con FLEXcombo® (grupo A, n = 20) o Porcilis PCV® y Stellamune® One (grupo B, n = 20). El segundo experimento se realizó en dos granjas, en las cuales se vacunaron a los 7 días después del destete a 40 lechones cruzados comerciales y a 40 lechones ibéricos. En cada granja, un grupo (A, n = 20) fue vacunado con FLEXcombo® y otro grupo (B, n = 20) con Porcilis® PCV-Mhyo. Se tomaron muestras de sangre antes de la vacunación, y a las 24 h y 48 h después de la vacunación. Las TR se registraron antes y 8 h después de la vacunación. Se registró un aumento en el grupo B en TR ( $p < 0.01$ ) y en las concentraciones de PFA ( $p < 0.01$ ) en los diferentes muestreos realizados después de la vacunación en comparación con el grupo A. Las vacunas que produjeron mayores aumentos en TR también produjeron mayores incrementos en las PFA, pero no se encontró influencia del día de la vacunación o de la raza. Por lo tanto, las concentraciones séricas de las PFA diferían según la vacuna utilizada, lo que puede ser útil, junto con la TR, para elegir la vacuna o protocolo que produce una respuesta de fase aguda (RFA) de menor magnitud.

En conclusión, la presente tesis doctoral muestra por un lado que, en el caso concreto de la vacuna de circovirus (Ingelvac CircoFLEX®), la presencia de anticuerpos maternos en el momento de la vacunación no supone una interferencia sobre la eficacia de dicho producto biológico. Por otro lado, se muestra la capacidad de un sistema de nebulización de partículas para favorecer la exposición a Mhyo, lo que constituye una herramienta que podría ser de gran utilidad a la hora de aclimatar a las futuras cerdas reproductoras para el control sostenido de la neumonía enzoótica. Y, por último, se

## Resumen

---

demuestra que el uso de las proteínas de fase aguda medibles en el suero de los lechones, constituyen unos biomarcadores fiables para evaluar la seguridad de las vacunas.



## Summary

---

Effective and sustained control of diseases over time remains the great challenge of veterinary specialists in pigs. For such purpose, these professionals use different strategies to achieve this objective considering the idiosyncrasies of an industry, which is constantly evolving. The industrialization of the sector has altered the epidemiology of different pathogens of these populations and therefore their control must be permanently reviewed and improved.

In this sense, swine veterinary preventive medicine rests on three pillars, preventing infection, maximizing immunity and minimizing exposure. The first statement is related to external and internal biosecurity measures that have to be strictly applied in the herds to avoid new pathogens entrance and dissemination through the population. To generate a protective immunity against the main porcine pathogens, the industry has invested many resources in the design of vaccines that contribute to the reduction of the use of antibiotics and the improvement of technical and animal welfare indexes. These vaccines contain specific antigens or the live attenuated pathogen causing disease, with the main objective of generating an effective immune response of the individual to minimize the impact of the infection when it occurs. Minimizing pathogens exposure is the goal of the implementation of several management rules (facilities cleaning and disinfection, all-in/all-out strategies, unidirectional flows, etc.) that are meant to reduce the pathogens infection pressure.

Currently, more than 70% of swine vaccines that are marketed worldwide are against circovirus associated disease (Porcine circovirus 2, PCV-2), Enzootic Pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhyo), and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). The economic impact of these diseases is too high to be able to do

## Summary

---

without vaccinating animals as an effective means of control. Vaccination programs against these costly diseases can be very diverse. It is extremely important that prevention protocols have to be designed specifically for every herd based on pathogens dynamics evidence in the population. Thus, the epidemiology of each disease should be monitored on regular bases in order to adapt every control program if required. Vaccination of breeders and piglets is revealed as the most complete strategy to generate robust immunity of the entire herd. It has been shown that minimizing immunological subpopulations in a group of individuals is the clue of sustained disease control over time.

When the vaccines are applied at moments in the life of the pig where the antibodies of maternal origin (AOM) are still present, these could pose a barrier against the vaccine antigens. Certainly, the timing of vaccination of animals against PCV-2 is determined by several crucial factors. On the one hand, knowing the epidemiology of PCV-2 is decisive since the infection time of the piglets will determine the vaccination age. On the other hand, it is important to know the time that the vaccine needs to confer protective immunity in the face of the challenge of the field pathogen, that is, the beginning of the immunity of the vaccine. Last, and not least, in pig production, the optimal moment for piglets to be vaccinated (handled) is generally around the weaning age at three or four weeks of age with 6 kilos average body weight. In this complex scenario, the very common presence of antibodies from the mother's colostrum and transferred in the first hours of the pig's life comes into play. These antibodies circulating in the piglet blood can interfere with the vaccine antigen and so with the efficacy of vaccination depending on their level. This circumstance is the one that is analyzed in depth in the first Chapter of this thesis.

Regarding the vaccination of piglets against Mhyo, it is generally accepted that it offers good results at the clinical and productive level; however, their consistency fluctuates largely depending on the prevalence of this pathogen in piglets at weaning. As previously mentioned, certain changes in the pig industry have favored the epidemiological change of some pathogens. Enzootic Pneumonia is a clear example of this, given that, in recent years, replacement source farms (multiplication farms) have eradicated the pathogen to offer animals free of this bacterium to production farms. Considering that most of them are positive for Mhyo, the effect of introducing negative animals in these populations has had direct consequences in increasing the prevalence of infection in piglets at weaning, thus making it difficult to control the disease. The intrinsic characteristics of Mhyo make this common pathogen in pig populations, an enemy that is difficult to control in a sustained manner over time. Specifically, the duration of excretion of this bacterium in infected animals can be extremely long (more than 200 days post-infection). The fact that replacement of sows enter a positive farm, being negative or positive, but late infected, often leads to the colonization of their piglets during the lactation phase. On the contrary, the infections at an early age of these future breeders could prevent the spread of their offspring. In this sense, different strategies have been carried out to obtain a homogeneous and early exposure of future breeders with inconsistent results. In the second Chapter, an exposure model to Mhyo is detailed with the goal of controlling this disease consistently.

Stimulating effective immunity using vaccines should be achieved with the least negative effects that these products sometimes have on animals. These are commonly called "adverse drug reactions". Traditionally, the evaluation of these undesirable

## Summary

---

reactions was carried out by measuring the rectal temperature (TR) of the animals after vaccination or by searching for local reactions at the point of inoculation. This information is usually found in the technical sheets or summaries of pharmaceutical products characteristics. There are also quantifiable blood parameters such as acute phase proteins (PFA) that reflect the physiological response to these stimuli, being an indirect way of evaluating the welfare of animals, in the moments after vaccination. These stress marker proteins will be evaluated in the third and last Chapter of this thesis.

For all the previously described reasons, the main objective of this Doctoral thesis was the comprehensive study of the efficacy and safety of PCV-2 and Mhyo vaccines, as well as the correct acclimation to Mhyo of young gilts, by demonstrating their influence on the productive performance and welfare parameters of pigs.

Thus, the objective of Chapter 1 was to analyze the effect of PCV-2 AOM levels on the efficacy of the vaccine in piglets vaccinated at three weeks of age with a commercial vaccine against this disease. The study was carried out by analyzing a database with 6,112 piglets from 4 different European regions. The results showed that the use of the vaccine was able to decrease the PCV-2 viremia calculated as the area under the curve ( $ABC = 60.29 \pm 3.73$  vs.  $198.27 \pm 6.14$ ), improve the average daily gain ( $GMD = 0.65 \pm 0.01$  kg/day vs.  $0.62 \pm 0.01$  kg/day) and reduce mortality (7% vs. 11%) in vaccinated piglets compared to non-vaccinated piglets respectively. The overall difference in GMD between both groups was close to 30 g per day ( $p < 0.05$ ), also when piglets were divided according to their low and high AOM levels. Furthermore, animals with the highest GMD were observed in the group of vaccinated piglets with high or extremely high AOM titers (0.66 and 0.65 kg/day, respectively). Likewise, the lack of correlation between GMD and AOM suggests

that there was no interference of AOM with the tested vaccine. The vaccinated animals grew faster compared to the unvaccinated control group animals, regardless of the level of AOM present at the time of vaccination. The results of the study showed that AOM against PCV-2 transferred through colostrum intake has a protective effect against this viral infection. The vaccine used (Ingelvac CircoFLEX®) was effective when applied at three weeks of age and was not affected by the level of AOM at the time of vaccination.

PCV-2 AOM transferred from the mother to the piglets may be challenging, in the efficacy of PCV-2 vaccines. In the case of the efficacy of vaccination against Mhyo in piglets, the greatest limiting factor is the infection of piglets with the pathogen from their mothers during the lactation period. Under these conditions, there is no chance for the vaccine to generate immunity before the infection takes place. In this case, the objective to be pursued must be to vaccinate piglets with minimal lung colonization of Mhyo at the time of vaccination, which is generally carried out around weaning.

In this regard, the main objective of Chapter 2 was to evaluate the use of nebulization technology (Neb) for effective exposure of gilts to Mhyo bacteria under field conditions. To achieve the objective, a two-phase study was designed. Phase I consisted of exposure to a bacterial positive lung homogenate [study day (SD) 0] of 641 Mhyo-free gilts from four different batches of a breeder rearing unit (GDU). Batches 1 and 2 were exposed intratracheally (IT) and used as reference for batches 3 and 4, which were exposed through Neb. Tracheobronchial swabs (TBS) were taken at 14 and 28 days post-challenge (SD14 and SD28, respectively) to assess infection success by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR) in pooled samples. No statistically significant differences were observed in terms of proportion of positive TBS samples or in the bacterial load (mean Ct value)

## Summary

---

between the batches exposed by IT or by Neb at any point of the sampling. Then, in phase II of the study, a total of 1,160 replacement females from the same GDU belonging to three other different batches (batches 5-7) were exposed to Mhyo. In this case, TBS was collected in SD14 and the results were in line with those obtained in phase I. All samples were positive for Mhyo by rt-PCR. The information generated in this research consolidates the use of nebulization as a reliable method of exposure to Mhyo in field conditions. This implies a broader understanding of how to use and assign other viable strategies, which could complete standard protocols for acclimation of gilts to Mhyo before entering the breeding herd.

Although the efficacy of vaccines is decisive in the control of diseases generated by pathogens, it is no less important that they have to be products as safe as possible for piglets.

In Chapter 3 the objective of the study was to compare the safety of different vaccination protocols used against PCV-2 and Mhyo, studying two acute phase proteins, haptoglobin (Hp) and C-reactive protein (CRP), and changes in TR. In addition, the possible influence of the vaccination day and breed were analyzed. In the first experiment, 40 commercial crossbred piglets were vaccinated on the day of weaning with FLEXcombo® (group A, n = 20) or Porcilis PCV® and Stellamune® One (group B, n = 20). The second experiment was carried out in two farms, where 40 commercial crossbred piglets and 40 Iberian piglets were vaccinated 7 days after weaning. In each farm, one group (A, n = 20) was vaccinated with FLEXcombo® and another group (B, n = 20) with Porcilis® PCV-Mhyo. Blood samples were taken before vaccination, at 24 h and 48 h after vaccination. TRs were recorded before and 8 h after vaccination. Significantly greater

## Summary

---

increases were observed in group B in TR ( $p < 0.01$ ) and in PFA concentrations ( $p < 0.01$ ) in the different samples taken after vaccination compared to group A. The vaccines that produced greater increases in TR also produced greater increases in PFA, but no influence of vaccination day or breed was found. Therefore, serum PFA concentrations differed depending on the vaccine used, which may be useful, together with TR, to choose the vaccine or protocol that produces a smaller acute phase response (RFA).

In conclusion, this doctoral thesis shows, on the one hand, that, in the specific case of the circovirus vaccine (Ingelvac CircoFLEX®), the presence of maternal antibodies at the time of vaccination does not imply an interference with the efficacy of this biological product. Additionally, the capacity of a particle nebulization system to favor exposure to Mhyo is shown, which constitutes a tool that could be very useful when acclimatizing future reproductive sows for the sustained control of Enzootic Pneumonia. Finally, it is demonstrated that the use of measurable acute phase proteins in piglet serum constitute reliable biomarkers for evaluating the safety of vaccines.





## **2. LISTA DE ABREVIATURAS**



## Lista de abreviaturas

---

ABC: área bajo la curva.

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

AGP:  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida.

AOM: Anticuerpo de origen materno.;

AP:  $\alpha$ 1-antiproteasa.

Cp: Ceruloplasmina

CRP: Proteína C-Reactiva.

Ct: umbral de ciclo.

EE.UU.: Estados Unidos.

EEM: Error estándar de la media.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Fb: Fibrinógeno.

GDU: Recría de reproductoras.

GMD: Ganancia de peso media diaria

HP: Haptoglobina.

IFAT: Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes.

IFN- $\gamma$ -SC: Células secretoras de interferón gamma.

IHC: Inmunohistoquímica.

## Lista de abreviaturas

---

IL-10: Interleucina-10.

IPMA: Ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa.

ISH: Hibridación *in situ*.

IT: Intratraqueal.

MAPA: Ministerio de agricultura pesca y alimentación.

Mdt: Millones de toneladas.

Mhyo: *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Neb: Nebulización.

NEP: Neumonía Enzoótica Porcina.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PCV-2: Circovirus porcino 2.

PCV-2-ED: Enfermedad entérica por circovirus porcino 2.

PCV-2-LD: Enfermedad pulmonar por circovirus porcino 2.

PCV-2-RD: Enfermedad reproductiva por circovirus porcino 2.

PCV-2-SD: Enfermedad sistémica por circovirus porcino 2.

PCV-2-SI: Infección subclínica por circovirus porcino 2.

PCVAD: Enfermedades asociadas a circovirus porcino (EE.UU.).

PCVD: Enfermedades por circovirus porcino.

PDNS: Síndrome de dermatitis y nefropatía porcino.

PFA: Proteínas de fase aguda.

## Lista de abreviaturas

---

Pig-MAP: Proteína mayor de fase aguda porcina.

PMWS: Síndrome de desmedro multisistémico post-destete.

PPA: Peste porcina africana.

PRDC: complejo respiratorio porcino.

PRRS: Síndrome reproductivo y respiratorio porcino.

RFA: Respuesta de fase aguda.

rt-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

SAA: Amiloide sérico-A.

SD: Días de estudio.

TBS: Raspado traquebronquial.

TR: Temperatura rectal.

U.E.: Unión Europea.

USDA: Departamento de agricultura Agricultura de los Estados Unidos.

VGA: Virus de la gripe A.



## **3. INTRODUCCIÓN**





En esta introducción analizamos el peso específico que tiene el sector porcino como motor de la economía a nivel mundial en términos generales y como potente dinamizador económico de España en particular. Revisaremos del mismo modo, cuáles son los grandes desafíos sanitarios que amenazan a esta industria describiendo dos de las enfermedades más importantes del ganado porcino a nivel global y cómo esta industria ha evolucionado hacia nuevas estrategias de prevención y protocolos vacunales. Finalmente, se revisa cómo medir la reacción de estos protocolos vacunales estándar sobre el organismo de los lechones.

### **3.1. LA IMPORTANCIA DEL SECTOR PORCINO**

La industria cárnica más importante a nivel mundial es la porcina (Knox, 2014). Con un consumo de 110 millones de toneladas (mdt); le siguen en importancia la carne de pollo, con 104 mdt, y la carne de bovino, con 67 mdt. En términos porcentuales el cerdo representa el 37% de toda la carne consumida a nivel mundial (Zhang et al., 2018). Esta carne juega un papel de vital importancia en el aporte de proteína de alta calidad a los seres humanos (Miller & Ullrey, 1987). De acuerdo con el reporte anual *Livestock and Poultry: World Markets and Trade* del 10 de enero de 2020 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), en el año 2018 se alcanzó el récord de producción mundial con 112.94 mdt. Sin embargo, como consecuencia de la grave crisis sanitaria motivada por la Peste Porcina Africana (PPA) iniciada en China y extendida en otros muchos países de Asia y Europa, se ha observado en 2019 un descenso de la producción mundial a 106 mdt y con una previsión para cerrar 2020 en 96 mdt. En el año de producción récord, la producción mundial de carne de cerdo fue liderada por China,

## Introducción

---

que produjo 54 mdt de carne de cerdo en ese año. La Unión Europea (U.E.) y los Estados Unidos (EE.UU.) ocuparon los puestos segundo y tercero, respectivamente.

El informe trimestral de Rabobank resalta que las crecientes presiones sanitarias continuarán siendo determinantes para la situación de los mercados de proteína animal en el 1<sup>er</sup> trimestre de 2020 (Rabobank, 2020; <https://research.rabobank.com>). Tal y como indica Chenjun Pan, Analista Senior de Proteína Animal, *“a pesar de que el impacto de la Peste Porcina Africana (PPA) se ha reducido en algunas regiones, el alcance de la enfermedad se ha expandido en los últimos meses. Las ramificaciones en el 2020 implicarán la necesidad de mantenerse cautelosos en la expansión de la producción en algunas regiones y una mayor demanda de las importaciones en el balance general”*. La PPA sigue propagándose por China, aunque a un ritmo más lento. Se han implementado políticas para favorecer la reposición y la expansión de la producción. Dado que esta reposición se está basando principalmente en las cerdas jóvenes, es probable que se produzca una caída en la producción local que reducirá la producción general, lo que supondrá un incremento de las importaciones que podría alcanzar cifras récord. Tras el ligero descenso acontecido en 2019, la producción porcina en la U.E. se podría incrementar en un 1% en 2020 debido al incremento de los precios y de las demandas de exportación.

Según fuentes del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), el sector porcino español tiene una importancia clave en la economía de nuestro país ya que supone en torno al 14% de la Producción Final Agraria. Dentro de las producciones ganaderas, el sector porcino ocupa el primer lugar en cuanto a su importancia económica alcanzando cerca del 39% de la Producción Final Ganadera. Durante los últimos años el sector porcino ha crecido notablemente, tanto en producción, como en censos y en

número de explotaciones, gracias al empuje de los mercados exteriores apoyado, a su vez, en la competitividad del sector en el mercado mundial.

Todo ello ha convertido a España en el 2019 en el cuarto país mayor productor mundial y segundo de la U.E. (detrás de China, EE.UU. y Alemania) y en el tercer exportador mundial y primero de la U.E. (solo detrás de EE.UU. y Canadá) con cerca de un 53% de su producción exportada (Informe SICE, febrero 2020).

Como hemos visto, uno de los principales factores que podría reducir el crecimiento de la producción mundial de carne de cerdo, y en consecuencia el comercio internacional, sería el estado sanitario de esta ganadería. Además de la ya citada PPA, existen otras enfermedades del porcino con una repercusión económica importante sobre los costes de producción y por ende sobre la eficiencia productiva y la competitividad. De hecho, en un estudio realizado en EE.UU. se estimó que el coste económico para la industria porcina americana del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), uno de los principales virus que afectan a estos animales, ascendía a 664 millones de dólares al año (Holtkamp et al., 2013). Otro estudio realizado más tarde en Europa estimó el coste asociado a esta enfermedad entre 100€ y 200€ por cerda inventariada y entre 5€ y 10€ por cerdo comercializado (De Paz, 2015). Con respecto al impacto económico de la circovirus porcina dentro del territorio de la U.E., se cuantificaron pérdidas anuales asociadas a esta enfermedad por valor de 600 millones de euros (Armstrong & Bishop, 2004). Sin embargo, las enfermedades en muchas ocasiones, no se presentan solas en el campo pudiendo tener un impacto económico mayor sobre el coste de producción que su presentación aislada. En concreto, en un estudio publicado por Dykhuis-Haden y colaboradores en 2012 (Dykhuis-Haden et al., 2012), se analizó la combinación de

diferentes patógenos porcinos como PRRS, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) y la gripe encontrando en algunos casos hasta un impacto superior a los \$10 por cerdo de engorde. En definitiva, se demuestra la importancia que tiene el control de las enfermedades sobre la eficiencia de la producción porcina.

En el contexto actual y en un mundo tan globalizado, no solo la situación sanitaria porcina afecta a la producción de carne de cerdos, sino también eventuales enfermedades emergentes en humano. El SARS-Cov-2 están causando problemas en las plantillas de diferentes mataderos de EE.UU. (*COVID-19-US: gestión de los animales en granja ante el cierre de las plantas procesadoras*; [www.3tres3.com](http://www.3tres3.com)) provocando problemas de abastecimiento a la población por falta de sacrificio de los animales.

### **3.2. PROTOCOLOS SANITARIOS GENERALES Y DE PREVENCIÓN EN GANADERÍA PORCINA**

Las estrategias de control que se han venido utilizando hasta la fecha, han contribuido en cierta medida a contener el efecto devastador que podrían tener estas enfermedades sin medidas de contención. La evolución de las herramientas de diagnóstico hacia técnicas de mayor sensibilidad y especificidad como la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) o incluso a tiempo real (rt-PCR) a unos costes más accesibles, han ayudado al sector a tener un mayor conocimiento de la dinámica de infección de los patógenos en las poblaciones (Bowman et al., 2012; Boyd et al., 2019; Lebret et al., 2019; Sunaga et al., 2019). Este mejor entendimiento de la epidemiología de los patógenos ha conllevado el diseño de nuevos modelos de producción para favorecer un mejor manejo de los flujos de animales acorde a su estatus de infección, pero también según el riesgo de contraer enfermedades. Por ejemplo, los sistemas de producción en

tres sitios independientes y alejados, esto es, núcleos de reproducción (producción de lechones de 6 kilos), transición (crecimiento de 6 a 18 kilos) y engorde (de 18 kilos a sacrificio), han contribuido a la reducción de las transmisiones horizontales de patógenos al evitar la mezcla de animales de orígenes y de edades diferentes (Harris, 2000). En un estudio sobre dinámicas de Mhyo se demostró que los cerdos criados en sistemas de tres sitios separados tuvieron menos probabilidad de ser PCR positivos a Mhyo (5%) mientras que los animales criados en sistemas de 1 o 2 sitios tuvieron mayor probabilidad de ser positivos (59.52%) (Sibila et al., 2004). La evolución de las tecnologías también ha provisto a la industria de instalaciones tecnificadas con sistemas de control de ventilación, temperatura y humedad relativa que sin lugar a duda favorecen mejores condiciones de bienestar y de salud de las piaras actuales (Sanmartin, 2017). La aparición de vacunas eficaces frente a estas enfermedades ha promovido el cambio de los profesionales veterinarios hacia unas estrategias eminentemente de prevención, favoreciendo así un uso cada vez más racional de los antibióticos. De hecho, el informe de 12 de julio de 2019 de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) anunciaba que *“España reduce un 7.2% el consumo de antibióticos en salud humana y un 32.4% las ventas de antibióticos veterinarios”*.

Tal como se describe en el artículo *“Profilaxis en ganado porcino”* (Quiles et al., 2013) los programas vacunales actuales frente a virus (PCV-2, PRRS o Parvovirus porcino entre otros) y bacterias (Mhyo, *Erysipelothrix rhusopathiae* o *Pasteurellas*), se establecen en tres niveles fundamentales. El primer nivel es aquel que previene de las enfermedades a las futuras reproductoras mediante vacuna y re-vacuna previo a su ingreso en el hato reproductor, donde se enfrentarán a patógenos nuevos para ellas. El segundo nivel se

centra en mantener un nivel inmunitario elevado en las cerdas multíparas, con objeto de evitar las subpoblaciones inmunológicas susceptibles de infectarse o re-infectarse. Para ello se establecen protocolos de vacunación a modo de “*recuerdo*” inmunológico, sobre toda la población de cerdas desde 2 hasta 4 veces al año en función del patógeno para el que se vacuna. Generalmente, esta vacunación previene las manifestaciones clínicas de las enfermedades en términos reproductivos, pero también tienen un efecto doble sobre la protección de la progenie. En efecto, la vacunación de las madres reduce la infección de sus crías al reducir las infecciones intrauterinas en algunos patógenos como por ejemplo PRRS (Scortti et al., 2006) o PCV-2 (Figueras et al., 2018c) y la colonización de bacterias como Mhyo (Arsenakis et al., 2019). En el tercer nivel se encuentran los programas vacunales de los lechones cuyo objetivo es prevenir las consecuencias negativas de las infecciones a las que se enfrentarán en su etapa de crecimiento hasta el sacrificio. Generalmente se vacunan en torno al destete, habitualmente a las 3-4 semanas de edad, porque es el momento en el que los anticuerpos transferidos por la madre comienzan a decaer y de esta forma se intenta evitar la posible interferencia demostrada con las vacunas (Fraile et al., 2012b). Habitualmente la vacunación suele ser mediante una sola dosis, aunque en casos en los que exista presencia de una elevada inmunidad maternal se establecen pautas de vacuna y re-vacuna separadas 3 semanas (Akashi et al., 2012).

### **3.3. PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL GANADO PORCINO**

#### **3.3.1. La circovirus porcina (Circovirus porcino 2: PCV-2)**

La epizootia de la infección por PCV-2 ha producido pérdidas económicas multimillonarias en la industria porcina a nivel mundial por el severo incremento en la mortalidad en las fases posteriores al destete de los lechones (Horlen et al., 2007;

Kixmöller et al., 2008). Este hecho ha provocado que haya sido una de las enfermedades porcinas más estudiadas en las últimas décadas.

### 3.3.1.1. Etiología

PCV-2 es uno de los virus más pequeño conocido actualmente. Mide unos 17 nm de diámetro, tiene una simetría icosaédrica, carece de envuelta y consta de un genoma ADN circular de una sola cadena con polaridad negativa de 1766 – 1768 nucleótidos de longitud (Meehan et al., 1998; Shang et al., 2009). Pertenece al género *Circovirus* de la familia *Circoviridae*. Hasta la fecha se han descrito 6 genotipos entre los cuales PCV-2a, PCV-2b y PCV-2d tienen una virulencia demostrada, mientras que la relevancia clínica de los otros 3 genotipos es todavía desconocida (Franzo & Segalés, 2018). La proteína ORF2 de la cápside tiene propiedades inmunogénicas, siendo capaz de inducir una respuesta humoral y celular efectiva, por lo que no es sorprendente que sea el elemento común en las vacunas comerciales frente a PCV-2.

### 3.3.1.2. Epidemiología

El PCV-2 es un virus de distribución ubicua, de manera que se han detectado anticuerpos frente al virus o el propio agente en cerdos de todos los países del mundo donde se ha buscado (Segalés et al., 2005). Hasta la fecha, el cerdo doméstico y al jabalí han sido identificados como sus únicos hospedadores naturales (Rodríguez-Arrijoja et al., 2003; Vicente et al., 2004).

La epidemiología de esta enfermedad viene en gran medida determinada por las características particulares de PCV-2. El virus es muy resistente en el ambiente, mostrando también una gran resistencia a los tratamientos químicos y térmicos (Royer et al., 2001).

### 3.3.1.3. Patogenia

Los lechones se pueden infectar con el PCV-2 durante la vida prenatal o postnatal, dando lugar a diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad (Segalés et al., 2005). En los fetos jóvenes de 40 – 70 días de gestación, el virus se replica principalmente en el corazón, seguido del hígado, los órganos linfoides y los pulmones (Sánchez et al., 2001, Saha et al., 2010). Las células diana principales en esa etapa son los cardiomiocitos, hepatocitos y las células del linaje monocítico (Sánchez et al., 2003). Tras el nacimiento, el tropismo celular se centra principalmente en linfoblastos y células de la línea celular monocítica, los primeros son totalmente susceptibles mientras que en las células del linaje monocítico, la presencia de partículas virales rara vez conduce a una infección productiva (Sánchez et al., 2004; Lefebvre et al., 2008).

### 3.3.1.4. Transmisión

El PCV-2 tiene la habilidad de transmitirse a través de diferentes vías, sin embargo, la infectividad depende de factores como la susceptibilidad del huésped, la patogenicidad de la cepa, así como la forma y tipo de exposición (Thrusfield, 1995). Los estudios de infección experimental han demostrado que el PCV-2 es excretado a través de diferentes secreciones (Shibata et al., 2003) tanto de animales enfermos como de cerdos con infección subclínica, pero la cantidad de virus eliminado es mayor en animales con signos clínicos asociados al PCV-2 (Segalés et al., 2005). La exposición de lechones no infectados con un grupo de cerdos inoculados 42 días antes con el virus, demostró la transmisión horizontal por contacto directo entre animales infectados y susceptibles (Bolin et al., 2001). Por su parte, Yang y colaboradores (Yang et al., 2003), reportaron la detección del



ADN viral en el tracto digestivo de cerdos con y sin enfermedad entérica sugiriendo la importancia de las heces en la transmisión oro-fecal del agente.

Experimentalmente, también se ha demostrado que el virus puede transmitirse de forma vertical a través de la inoculación *in utero* de fetos (Johnson et al., 2002; Sánchez et al., 2001, 2003) o mediante la infección intranasal de cerdas preñadas antes del parto (Park et al., 2005; Ha et al., 2008).

Por otro lado, se ha demostrado que los machos infectados con PCV-2 son capaces de excretar el virus vía semen y que éste puede ser infeccioso. Esto se observó tras la detección de viremia y de anticuerpos frente a PCV-2 en lechones seronegativos después de inocularlos intraperitonealmente con semen positivo para PCV-2. Sin embargo, se inseminaron 6 cerdas seronegativas con este mismo semen y no se detectó viremia ni anticuerpos frente a PCV-2 en ninguna de las cerdas durante toda la gestación, así como tampoco en ninguno de los fetos (Madson et al., 2008).

El hecho que prácticamente todos los animales se infectan en un momento u otro a lo largo de su vida (López-Soria et al., 2005) indica que la transmisión horizontal del PCV-2 es por lo tanto muy eficiente.

### 3.3.1.5. Signos clínicos y lesiones

En la actualidad se habla de las enfermedades asociadas con el circovirus porcino (PCVD en Europa y PCVAD en Norteamérica). De este modo el PMWS (síndrome adelgazamiento post-destete) ha pasado a denominarse enfermedad sistémica asociada a PCV-2 (PCV-2-SD) (Segalés, 2012). Además de esta presentación patológica, PCV-2 también se asocia con otras manifestaciones como enfermedad subclínica (PCV-2-SI), enfermedad reproductiva (PCV-2-RD), el síndrome dermatitis nefropatía porcina (PDNS),

enfermedad pulmonar (PCV-2-LD), enfermedad entérica (PCV-2-ED). Pese a todo ello desde la utilización masiva de las vacunas, la manifestación clínica más común de la infección por el PCV-2 es la forma subclínica. Esta se caracteriza por un crecimiento y desarrollo subóptimo de los animales en granjas aparentemente sanas (Young et al., 2011).

### 3.3.1.6. Diagnóstico

La mera presencia de animales con pérdida de peso o signos respiratorios en las etapas de transición-engorde y la observación de lesiones macroscópicas compatibles con la enfermedad no son suficientes para confirmar un diagnóstico de circovirus porcino, por tal motivo el diagnóstico confirmatorio se basa en el hallazgo de criterios clínicos, patológicos y virológicos (Sorden, 2000; Segalés et al., 2005).

El diagnóstico individual incluye la presentación de los signos clínicos, los hallazgos de lesiones histopatológicas características y la identificación del PCV-2 mediante pruebas de inmunohistoquímica (IHC) o hibridación *in-situ* (ISH) (Segalés & Domingo, 2003). Como se trata de una enfermedad multifactorial en la cual además del virus, participan otros factores externos e internos que determinan la ocurrencia de PCVD (Opriessnig et al., 2007), es necesario establecer un diagnóstico diferencial para cada una de las condiciones clínicas relacionadas con el PCV-2. Por otro lado, desde el punto de vista del laboratorio es relativamente sencillo detectar la infección subclínica mediante la demostración del antígeno mediante PCR o anticuerpos mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), pero debido a la naturaleza ubicua del agente y la manifestación subclínica de la enfermedad, estas observaciones deben ser

contrastadas con los datos de campo para la correcta interpretación de los resultados de laboratorio (Segalés et al., 2012).

### 3.3.1.7. Tratamiento y control

Tradicionalmente, antes del uso generalizado de las vacunas, la prevención de la infección por PCV-2 y PCVD dependía principalmente de las "20 reglas de Madec" (Madec et al., 2000, 2001). Dicho plan incluía medidas basadas en el manejo, el medio ambiente y la salud de los cerdos. En resumen, esta guía recomienda procedimientos completos de desinfección, limitar el contacto entre cerdos, evitar mezclar lotes de diferentes edades/orígenes, aislamiento o eutanasia de cerdos enfermos, mantenimiento correcto del flujo de aire a temperatura adecuada y condiciones adecuadas de espacio en corrales, aplicar tratamientos anti-parasitarios y programas de vacunación recomendados, y nutrición equilibrada para el rebaño. La implementación de este plan puede reducir de manera eficiente la infección por PCV-2 y la aparición de PCVD y ahora es aceptado por la industria porcina como una guía básica de gestión (Zhai et al., 2014). Además, algunos estudios han demostrado que la mejora del alojamiento, el manejo de la granja y las prácticas de cría pueden afectar el curso de la infección por PCV-2 y prevenir en cierta medida el impacto de la PCVD (López-Soria et al., 2005; Dewey, 2008; Andraud et al., 2009; Rose et al., 2009). Entonces, los siguientes puntos han sido sugeridos por Rose et al. (2012) como factores de riesgo para la aparición de ES-PCV-2:

a) Condiciones de alojamiento: corrales grandes en instalaciones de destete, proximidad a otras granjas de cerdos y un pozo común entre diferentes salas de engorde.

b) Programas de vacunación: se observó que la vacunación de cerdas contra PRRSV y el uso de vacunas separadas contra *Erysipelothrix rhusiopathiae* y Parvovirus porcino en

cerdas son factores de riesgo, mientras que la vacunación de cerdas contra *Escherichia coli* y rinitis atrófica era protectora.

c) Prácticas de higiene y cría: cortos períodos de vacío en los departamentos de transición y parto, incremento de la mezcla de cerdos, destete temprano (<21 días), entrada de primerizas de reemplazo, uso de verracos de granja para la recolección de semen, cerdas en malas condiciones inducidas por malas técnicas de inyección y tratamientos escasos contra ectoparásitos en cerdas.

d) Bioseguridad: falta de duchas en vestuarios y visitantes en contacto con contacto previo con otros cerdos antes de visitar la granja.

e) El control de la co-infección por PCV-2 con otros patógenos también es un paso crucial para prevenir las PCVD, ya que las enfermedades resultantes son inducidas por la presencia de infecciones concurrentes.

Además, existe información que los antecedentes genéticos o la raza de animales son importantes para prevenir los casos de PCVD, ya que se ha descrito la existencia de susceptibilidad y resistencia genética (Rose et al., 2012). En condiciones experimentales, los cerdos *Landrace* fueron más sensibles a la infección por PCV-2 en comparación con los animales *Duroc*, *Large White* y *Pietrain*, porque se observó una puntuación más alta de lesiones microscópicas asociadas a PCV-2 en los cerdos *Landrace* (Opriessnig et al., 2006a, 2009b). En condiciones de campo, los cerdos *Pietrain*, puros o cruzados, tuvieron menor mortalidad en comparación con los cerdos cruzados *Large White-Duroc* (López-Soria et al., 2011). Por el contrario, Rose et al. (2005) no mostraron ningún efecto protector mediante la introducción de la raza *Pietrain* en una granja afectada por PCV-2-SD. En

general, los mecanismos subyacentes de mayor o menor susceptibilidad genética o resistencia a PCVD siguen siendo desconocidos.

Hoy en día en control de la circovirus porcina pasa por la vacunación de los animales. Actualmente existe un total de 4 vacunas comerciales disponibles para la industria porcina. Dado que estas vacunas se comercializaron en diferentes países, sus nombres pueden variar de un país a otro; sin embargo, las vacunas de la misma compañía farmacéutica tienen el mismo diseño básico. Todas esas vacunas son diferentes en términos de antígeno y tipo de adyuvante, licencia (cerda / lechones o ambos) y uso recomendado (Beach & Meng, 2012; Chae, 2012; Meng, 2013). El número de vacunas de PCV-2 disponibles en algunos países asiáticos es mayor, principalmente debido a que los laboratorios locales comercializan sus propios productos (Zhai et al., 2014).

La primera vacuna comercializada contra PCV-2 (Circovac<sup>®</sup>, Merial, Inc.), es una vacuna PCV-2a inactivada adyuvantada con aceite de parafina ligera, distribuida en Francia y Alemania en 2004 (Charreyre et al., 2005). Posteriormente (2007), esta vacuna estuvo disponible en otros países europeos y Norteamérica. Inicialmente, Circovac<sup>®</sup> tenía licencia para aplicarse en cerdas multíparas y cerdas de reposición a las 2-4 semanas antes del parto; más tarde, se autorizó para lechones mayores de 3 semanas de edad mediante el uso de una dosis reducida (Beach & Meng, 2012; Chae, 2012; Fraile et al., 2012a; Meng, 2013). La segunda vacuna que se lanzó fue de Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. (Ingelvac CircoFLEX<sup>®</sup>), una vacuna de subunidades basada en la proteína de la cápside de PCV-2a (proteína ORF2) expresada en los sistemas de baculovirus (Chae, 2012) y sometida a un proceso posterior de purificación del antígeno (PCA<sup>™</sup>). El adyuvante contiene un polímero (carbopol) acuoso. Esta vacuna está registrada tanto

## Introducción

---

para hembras como para lechones con la misma dosis de 1 ml para ambos tipos de animales. Además de estas vacunas existen otros 2 productos biológicos con licencia únicamente para cerdos en crecimiento mayores de 2 o 3 semanas de edad. Suvaxyn Circo lanzada en Europa (llamada Foster PCV en EE.UU. de Zoetis Inc.) es una vacuna vírica quimérica atenuada con un adyuvante de sulfolipociclodextrina en escualeno en agua. El virus quimérico se construyó insertando el gen ORF2 de PCV-2a en el esqueleto de PCV1 no patógeno (Fenaux et al., 2003, 2004). Porcilis PCV® en Europa (Circumvent® en EE.UU. de Merck. Inc) es una vacuna de subunidades basada en la proteína de la cápside de PCV-2a (proteína ORF2) expresada en los sistemas de baculovirus en este caso sin proceso adicional de purificación. El adyuvante contiene D1-a-tocoferol más parafina líquida (Chae, 2012).

Actualmente, la vacuna PCV-2 se considera la herramienta más eficiente para controlar la infección por PCV-2 y PCVD. El control eficiente de las vacunas PCV-2 ha sido bien demostrado tanto en condiciones experimentales como de campo. Dichas vacunas pueden disminuir o reducir la mortalidad, los signos clínicos, la carga de viremia, la tasa de co-infección y las lesiones asociadas a PCV-2. Además, pueden mejorar las respuestas inmunes específicas de PCV-2, la GMD, el peso corporal al sacrificio, los parámetros reproductivos y en definitiva ayudan a aumentar las ganancias de la industria porcina (Fort et al., 2008; Thacker et al., 2008; Pejsak et al., 2010; Martelli et al., 2013).

Los datos disponibles en la literatura indican que todas las vacunas comerciales de PCV-2 pueden inducir inmunidad humoral y mediada por células en cerdas y lechones (Fort et al., 2009; Chae, 2012; Martelli et al., 2013; Park et al., 2014; Seo et al., 2014). Actualmente se pueden utilizar tres estrategias diferentes para vacunar contra PCV-2:

cerda, lechón o ambos. El propósito de las tres estrategias es prevenir las PCVD y reducir la presión de infección de PCV-2 en el rebaño.

Para evitar la aparición de PCVD en lechones, una estrategia es vacunar al rebaño de cría. De las vacunas mencionadas anteriormente, solo Circovac® e Ingelvac CircoFLEX® tienen licencia para vacunar las reproductoras. Con Circovac® se recomienda vacunar a las cerdas con dos dosis separadas de 3 a 4 semanas, como mínimo 2 semanas antes del parto y en las gestaciones posteriores solo se recomienda una dosis de refuerzo a las 2-3 semanas antes del parto (Beach & Meng, 2012; Fraile et al., 2012a). Mientras que con Ingelvac CircoFLEX® se recomienda la vacunación en sábana de toda la población al menos 2 veces al año.

Aunque el diagnóstico definitivo de PCV-2-RD es ciertamente complejo, algunos datos muestran que la vacunación de las reproductoras también puede aumentar el número de nacidos vivos, el peso al nacer y disminuir la tasa de abortos, y lechones momificados por cerda (Vila, 2004; Pejsak et al., 2012; Hauray & Deslisle, 2013; Figueras et al., 2018a,b).

Tanto en condiciones experimentales como de campo, la vacunación de cerdas reproductoras puede reducir la viremia PCV-2, la carga viral sistémica, la lesión linfoide en lechones y mejorar la GMD en las crías infectadas subclínicamente (Segalés, 2015). Está bien documentado que la protección generada por la vacunación de cerdas proviene de la inmunidad maternal (Allan et al., 2002; McKeown et al., 2005; Fraile et al., 2012b). Esta vacunación puede aumentar el anticuerpo anti-PCV-2 en las secreciones, especialmente en el calostro (Gerber et al., 2011, 2012; Sibila et al., 2013). Además de la inmunidad humoral, se sabe que la respuesta inmune mediada por células [medida como células

secretoras de interferón gamma (IFN- $\gamma$ -SC) específicas de PCV-2] también se puede transferir de las cerdas a los lechones a través del calostro (Goubier et al., 2008). Estas IFN- $\gamma$ -SC específicas de PCV-2 derivadas de la madre pueden ayudar a proteger a los lechones de la infección (Oh et al., 2012). Sin embargo, la duración de esta inmunidad celular adaptativa derivada de la madre aún no está clara (Kekarainen et al., 2010; Oh et al., 2012).

El objetivo de la vacunación de lechones es evitar que se enfermen por medio de una respuesta temprana y significativa de anticuerpos e IFN- $\gamma$ -SC. La vacunación de lechones se aplica normalmente alrededor de las 2-4 semanas de edad, y puede reducir de manera eficiente la mortalidad, la viremia, la carga viral en los tejidos, las lesiones linfoides microscópicas y aumentar los parámetros productivos en los lechones (Segalés et al., 2009; Pejsak et al., 2010; Takahagi et al., 2010; Martelli et al., 2011; Haake et al., 2014; Segalés, 2015). Después de la vacunación, generalmente se observa una seroconversión temprana alrededor de las 3 semanas posteriores a la vacunación (Opriessnig et al., 2010; Fraile et al., 2012b; Triple et al., 2012). Sin embargo, no todas las vacunas muestran una seroconversión evidente a pesar de ser eficientes para controlar PCVD.

Hasta ahora, hay algunos datos disponibles que evalúan la eficacia de la combinación de la vacunación frente a PCV-2 en cerdas y lechones (Opriessnig et al., 2010; Pejsak et al., 2010; Fraile et al., 2012b; Oh et al., 2014). En condiciones experimentales, la vacunación de cerdas y lechones podría reducir significativamente la viremia y la carga viral en los tejidos linfoides (Opriessnig et al., 2010; O'Neill et al., 2012; Oh et al., 2014). Oh et al. (2014), observaron respuestas inmunes humorales y celulares más fuertes y puntuaciones de lesiones de ganglios linfáticos más leves en los lechones, en comparación



con los animales vacunados hijos de madres no vacunadas. Los datos de estudios de campo mostraron que esta estrategia también podría dar como resultado una GMD más alta que la vacunación única de cerdas o lechones (Pejsak et al., 2010; Fraile et al., 2012b).

Sin embargo, la estrategia de vacunación combinada ha generado preocupación sobre la posible interferencia con la inmunidad pasiva de origen maternal en la vacunación de lechones. Aunque la eficacia comercial de la vacuna PCV-2 se ha probado ampliamente en el control de la infección por PCV-2 y PCVD (Meng, 2013; Segalés, 2015), una posible interferencia de la IM sobre la eficacia de la vacuna aún está en debate.

### **3.3.2. Neumonía Enzoótica Porcina (*Mycoplasma hyopneumoniae*; Mhyo)**

La Neumonía Enzoótica porcina (NEP) está causada por la bacteria Mhyo que afecta fundamentalmente a los cerdos en etapa de crecimiento y engorde, cursando generalmente como enfermedad crónica, con alta morbilidad y baja mortalidad. Es una causa de elevadas pérdidas económicas en la producción porcina mundial debido al retraso de crecimiento, el aumento del índice de conversión, el incremento del gasto en medicación y sobre todo por la pérdida de homogeneidad de los lotes (Van Alstine, 2012).

#### 3.3.2.1. Etiología

Mhyo pertenece taxonómicamente a la clase Mollicutes. Es un organismo procariota que no tiene pared bacteriana y por ello son pleomórficos (Razin et al., 1998). Mhyo tiene un diámetro medio de 0.20 y 0.80  $\mu\text{m}$ , adopta formas que varían desde esférica a ovoide o piriforme, e incluso helicoidal, y está rodeado por una membrana simple (Tajima & Yagihashi, 1982; Blanchard et al., 1992). En la superficie externa de la membrana plasmática se aprecia una especie de cápsula, de naturaleza polisacárida. Estas proteínas

confieren al micoplasma una porción hidrófoba mínima que favorece la adherencia a las células respiratorias mediante interacciones hidrofóbicas (Razin et al., 1998).

Sobrevive bien en el agua de lluvia, hasta 17 días a bajas temperaturas (2-7 °C), lo que explicaría la transmisión aerógena por aire húmedo. Estas características conllevan unas claras implicaciones epidemiológicas y de bioseguridad (Otake et al., 2010; Browne et al., 2017).

### 3.3.2.2. Epidemiología

Mhyo es altamente prevalente en casi todas las áreas productoras de cerdos (Rautiainen et al., 2001; Fraile et al., 2010; Meyns et al., 2011; Fablet et al., 2012; Nathues et al., 2014). La ganadería porcina en Europa está generalmente infectada endémicamente con Mhyo, como lo ilustra la prevalencia de anticuerpos del 62.9% en Alemania (Nathues et al., 2014), 70.8% en Francia (Fablet et al., 2012), 79% en Bélgica (Meyns et al., 2011) y 82% en España (Fraile et al., 2010). Aunque los niveles más altos de infección ocurren durante el período de crecimiento y finalización (Sibila et al., 2009), la infección puede ocurrir en todas las fases de producción.

La infección por Mhyo en cerdas es común en áreas endémicas y alta densidad porcina (Calsamiglia et al., 2000; Sibila et al., 2007a,b; Grosse Beilage et al., 2009). En general se acepta que las reproductoras juegan un papel importante en el mantenimiento de la infección dentro de un rebaño ya que las cerdas infectadas pueden transmitir Mhyo a su descendencia (Sibila et al., 2007a; Grosse Beilage et al., 2009; Pieters et al., 2009; Roos et al., 2016). Particularmente, se ha sugerido que las cerdas de bajo número de partos son más infecciosas que las cerdas de mayor número de partos (Fano et al., 2007), denotando que los lechones de estas cerdas jóvenes pueden tener un mayor riesgo de volverse

positivos por transmisión vertical (Calsamiglia & Pijoan, 2000; Sibila et al., 2008). Como evidencia, el riesgo de que un rebaño tenga la infección en lechones aumentó cuando el número total de las primerizas compradas por año era más elevado (Nathues et al., 2013). En consecuencia, una aclimatación satisfactoria de las primerizas está ganando importancia, ya que puede dar como resultado una menor probabilidad de infección por Mhyo y de desarrollo de signos clínicos de NEP en cerdos de engorde (Nathues et al., 2014; Pieters & Fano, 2016).

### 3.3.2.3. Patogenia

Mhyo es un microorganismo extracelular cuya presencia sobre la mucosa del aparato respiratorio disminuye en el curso de la enfermedad, llegando prácticamente a desaparecer en las fases más avanzadas de la misma, pudiendo persistir o potenciarse su permanencia cuando está asociado a otros patógenos del aparato respiratorio del cerdo (Blanchard et al., 1992; DeBey & Ross, 1994; Sarradell et al., 2003).

El período de incubación de la NEP y el período activo de la enfermedad dependen de la exposición de los animales susceptibles y de la virulencia de la cepa implicada. El punto de acción de Mhyo es la membrana citoplasmática de las células epiteliales del aparato mucociliar de las vías respiratorias. Se adhiere al epitelio ciliado de las vías respiratorias, se multiplica y avanza por el árbol bronquial. La adhesión es un fenómeno de gran importancia en la patogenia de la enfermedad, ya que es el grado de adherencia el que determina la patogenicidad de las diferentes cepas de Mhyo. Las lesiones pulmonares son evidentes entre 7 y 10 días después de la infección, pero no son patognomónicas (Thacker, 2001; Sibila et al., 2009). Generalmente tras 8 semanas post-infección las lesiones se resuelven macroscópicamente.

La adhesión provoca, por un lado, la pérdida de los cilios comprometiendo el mecanismo natural de defensa, y por otro lado el efecto citopático (Thacker & Minion 2012). La muerte celular consiguiente y su descamación provocan, como respuesta, una hiperplasia epitelial que intenta reparar la pérdida de las células (Blanchard et al., 1992; Sarradell et al., 2003).

### 3.3.2.4. Transmisión

En cuanto a la transmisión, la principal fuente de infección en una granja es la introducción de cerdos con infección aguda o portadores. Tal como se ha mencionado anteriormente, las cerdas pueden transmitir la bacteria a su descendencia por contacto directo después del parto y hasta el momento del destete. A partir del destete comienza la amplificación de la infección y una transmisión muy significativa de Mhyo lo que resulta en un 100% de prevalencia de Mhyo (Maes et al., 1996; Fano et al., 2007) y un aumento gradual del número de animales seropositivos hacia el final del período de engorde (Sibila et al., 2007b). Dentro de los rebaños, Mhyo se transmite principalmente por contacto directo de cerdos infectados a susceptibles (Sibila et al., 2009), aunque la transmisión indirecta por el aire también parece desempeñar un papel en la propagación del agente dentro de una población (Leon et al., 2001; Fano et al., 2005). Sin embargo, el contacto nariz con nariz sigue siendo la ruta de transmisión más efectiva durante las fases agudas y crónicas de infección (Morris et al., 1995b; Marois et al., 2007; Pieters et al., 2010). Es importante destacar que los animales infectados experimentalmente con Mhyo pueden convertirse en portadores crónicos del patógeno y capaces de infectar cerdos susceptibles hasta más de 200 días después de la inoculación (Pieters et al., 2009).

### 3.3.2.5. Formas clínicas y lesiones

El principal signo clínico atribuido a la infección por Mhyo es una tos seca y no productiva (Sibila et al., 2009). Sin embargo, la tos es uno de los signos más comunes de enfermedad respiratoria y pueden ser causados por una variedad de agentes infecciosos (Nathues et al., 2012; Thacker & Minion, 2012). En rebaños endémicamente infectados por Mhyo, un insidioso inicio de tos seca, no productiva, que afecta particularmente a los cerdos al final de engorde sugiere la participación de Mhyo (Sibila et al., 2009; Nathues et al., 2012; Thacker & Minion, 2012). En una situación endémica, la tos podría aparecer durante todo el período de crecimiento y las infecciones subclínicas pueden también ser comunes (Sibila et al., 2009; Thacker & Minion, 2012). Cuando Mhyo se introduce en una población negativa, la situación mencionada se agrava, dado que los animales de todas las edades son susceptibles, la morbilidad aumenta significativamente y la tos suele ir acompañada de más signos clínicos graves como dificultad respiratoria aguda, pirexia y esporádicamente, la muerte de animales (Thacker & Minion, 2012).

La infección por Mhyo también se ha asociado con una reducción de parámetros de rendimiento de crecimiento, básicamente, la reducción de la GMD y el incremento del índice de conversión alimenticia (Straw et al., 1989). Cuando otros patógenos están involucrados, tanto los signos clínicos como la afectación de los parámetros de crecimiento son probablemente más severos y de origen multifactorial (Thacker & Minion, 2012).

En términos generales, la neumonía por Mhyo consta de áreas pulmonares consolidadas, a menudo bien delimitadas y más colapsadas que el tejido pulmonar normal adyacente, que afecta principalmente a las regiones cráneo-ventrales (es decir, lóbulos

apicales y cardíacos, y las partes craneales de los lóbulos diafragmáticos) (Van Alstine, 2012). Estas lesiones pueden aparecer desde una semana post-infección en adelante y alcanzar su máxima extensión y severidad en 4 semanas post-infección (Kobisch et al., 1993; Maes et al., 1996; Sørensen et al., 1997). La recuperación de la lesión es evidente en 8 semanas post-infección, aunque algunas lesiones macroscópicas (cicatrización interlobular con retracción del tejido) pueden permanecer hasta 12 semanas post-infección (Kobisch et al., 1993; Maes et al., 1996; Sørensen et al., 1997).

Es importante destacar que, aunque estas lesiones macroscópicas sugieren la participación de *Mhyo*, no son exclusivas de este organismo puesto que *Pasteurella multocida*, el virus de la Influenza porcina y, *Mycoplasma Hyorinis* pueden causar lesiones pulmonares macroscópicas similares (Thacker, 2001; Sibila et al., 2009).

Con respecto al efecto de la re-infección, un estudio demostró como un segundo desafío a las 16 semanas de edad (tras una primera infección a las 2 semanas de edad) no generó ni cuadro de tos ni lesiones pulmonares más que aquellas residuales procedentes del primer desafío (Kobish et al., 1993).

### 3.3.2.6. Diagnóstico clínico y diferencial

Los signos clínicos y las lesiones pulmonares mencionados anteriormente son la base de un diagnóstico presuntivo de micoplasmosis. Sin embargo, dada la falta de especificidad, el diagnóstico definitivo requiere la demostración de la implicación de *Mhyo* por pruebas de laboratorio (Thacker, 2004; Maes et al., 2008). Típicamente, el aislamiento y cultivo de un patógeno es considerado la prueba de referencia para el diagnóstico (Thacker & Minion, 2012). Sin embargo, en el caso de *Mhyo*, el cultivo bacteriológico no se utiliza para el diagnóstico de rutina, principalmente debido a su

exigente crecimiento *in vitro*. Por lo tanto, no pueden ser la base para descartar la infección (Maes et al., 2008; Sibila et al., 2009).

La monitorización del rebaño normalmente se basa en técnicas de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA), PCR y métodos de vigilancia del matadero (es decir, puntuación macroscópica de lesión pulmonar) (Sibila et al., 2009). Aunque las técnicas moleculares mejoran la detección de Mhyo, la evaluación de anticuerpos por serología sigue siendo el método más común utilizado para detectar la exposición al agente (Fano et al., 2012). Dado que cada una de estas técnicas de diagnóstico tienen limitaciones, su uso en combinación es necesario para optimizar la precisión diagnóstica (Sibila et al., 2009; Thacker & Minion, 2012).

A pesar de que la serología es particularmente útil desde el punto de vista económico, rápido y de alto rendimiento, la interpretación de los resultados puede ser desafiante. Deben tenerse en cuenta diversas consideraciones como:

a) Sensibilidad de la prueba: los resultados serológicos pueden variar según el kit de ELISA utilizado y el estadio de infección por Mhyo (Ameri-Mahabadi et al., 2005; Fano et al., 2012; Gomes Neto et al., 2014).

b) Especificidad de la prueba: puede tener lugar una reactividad cruzada con anticuerpos *M. flocculare* (Bereiter et al., 1990; Gomes Neto et al., 2014).

c) Momento de seroconversión: el momento en que los animales infectados producen anticuerpos séricos detectables es muy variable (Thacker, 2004; Sibila et al., 2009).

d) Coinfección con otros patógenos porcinos: puede aparecer un aumento de los niveles de anticuerpos cuando Mhyo está en coinfección con PRRSV (Thacker et al., 1999), gripe porcina (Thacker et al., 2001) o PCV-2 (Opriessnig et al., 2004a), aunque esto no se observa siempre (Sibila et al., 2012).

e) Vacunación: la serología no puede diferenciar entre anticuerpos consecuencia de la infección natural de aquellos debido a vacunación (Sibila et al., 2009).

f) Relación con las lesiones de consolidación craneoventral: pese a que no hay correlación entre títulos de anticuerpos aumentados después de infección y la protección (Kobisch et al., 1993; Djordjevic et al., 1997), se ha planteado una posible relación entre niveles de anticuerpos y lesiones pulmonares inducidas por Mhyo (Van Til et al., 1991; Yagihashi et al., 1993; Morris et al., 1995a; Fraile et al., 2010; Merialdi et al., 2012).

El tejido pulmonar, los hisopos traqueo bronquiales y los fluidos de lavados bronquio-alveolares son muestras recomendadas para la detección de Mhyo por PCR (Calsamiglia et al., 2000; Kurth et al., 2002; Marois et al., 2007; Strait et al., 2008; Fablet et al., 2010; Makhanon et al., 2012). La literatura actual sugiere los hisopos laríngeos como el tipo de muestra *in vivo* preferido para Mhyo en comparación con hisopos nasales y lavado traqueo-bronquial (Pieters & Rovira, 2013; Roos et al., 2016). Otra de las técnicas de toma de muestras en animales vivos que se está utilizando con mayor frecuencia actualmente debido a su elevada sensibilidad y facilidad de ejecución, es el TBS (Fablet et al., 2010; Vangroenweghe et al., 2015a,b, 2018a,b; Sponheim et al., 2020).

Existen diferencias genómicas entre las cepas de Mhyo, implicando una posible falta de detección de ciertos aislamientos por alguna PCR (Strait et al., 2008). En consecuencia, los métodos de tipificación genómica se están implementando gradualmente para



diferenciar cepas de Mhyo (De Castro et al., 2006; Vranckx et al., 2011; Tamiozzo et al., 2015).

### 3.3.2.7. Tratamiento y control

El control efectivo y la prevención de las enfermedades asociadas a Mhyo se basan en la optimización de las prácticas de gestión y condiciones de alojamiento, medicación antimicrobiana y vacunación (Maes et al., 2008). Sin embargo, todavía existen numerosas carencias de conocimiento para el correcto control de la enfermedad en todos los escenarios epidemiológicos (Maes et al., 2018). A continuación, describimos algunas de ellas:

#### a) Manejo de flujos e instalaciones

Los sistemas de producción en ciclo cerrado presentan una mayor presión de infección que los de 3 fases (Sibila et al., 2004). Por tanto, dos de las opciones de control mediante manejo pasan por el destete precoz aislado y la producción en múltiples fases. El objetivo es separar y especializar las fases de la producción, interrumpiendo así el ciclo de transmisión de los patógenos y disminuyendo la contaminación, obteniéndose animales libres de enfermedad (Alexander et al., 1980).

Además, las instalaciones deben garantizar un manejo estricto "*todo dentro-todo fuera*", estricta limpieza, desinfección y asegurar un periodo de descanso de las instalaciones entre lote y lote de animales (Clark et al., 1991). El flujo de animales siempre debe ser unidireccional, sin retornos hacia atrás. Es importante evitar la mezcla de animales de diferentes orígenes sanitarios. Se recomienda una separación entre los diferentes sitios de producción de al menos 500 m. En la medida de lo posible cada uno

de los sitios debería tener su personal propio y el movimiento de este se realizaría desde los animales más sanos a los menos sanos (Harris, 2000).

### b) Tratamiento

El uso de antibióticos como la tetraciclina, la tilosina, la lincomicina, la tiamulina, y las quinolonas han demostrado ser eficaces para tratar los animales con sintomatología y diagnóstico confirmado. Sin embargo, el empleo de antibióticos en el control de la NEP ha tenido éxitos variables en el control de pérdidas económicas debidas a esta enfermedad.

### c) Vacunación

La vacunación con bacterinas comerciales todavía se considera la práctica más efectiva para controlar la infección por Mhyo (Mateusen et al., 2002; Thacker & Minion, 2012). De hecho, la vacunación está ampliamente extendida en países con sistemas intensivos de producción porcina, siendo aplicada en algunos casos en más del 70% de los rebaños (Maes et al., 2008).

La vacuna contra Mhyo ha demostrado ser eficaz (Baccaro et al., 2006; Villarreal et al., 2011; Tassis et al., 2012; Vranckx et al., 2012; Wilson et al., 2012; Arsenakis et al., 2016). En general, el beneficio de la vacunación se basa en la reducción de los signos clínicos y las lesiones pulmonares, reduciendo las pérdidas de rendimiento y la medicación antimicrobiana (Maes et al., 2008; Simionatto et al., 2013). A pesar de los beneficios anteriores, estas bacterinas proporcionan solo protección parcial, y no previenen la colonización de Mhyo (Thacker et al., 2000), y la transmisión entre cerdos vacunados no se reduce significativamente (Meyns et al., 2006; Pieters et al., 2010; Villarreal et al., 2011). Además, se ha demostrado que la eficacia de la vacuna varía de un

rebaño a otro. Una hipótesis planteada para explicar esta variación son las diferencias antigénicas entre las cepas que circulan en los rebaños de cerdos y la cepa de la vacuna (Tamiozzo et al., 2015; Villarreal et al., 2011, 2012). En relación con este asunto, los resultados recientes indican que la vacunación de los lechones contra Mhyo no conducen a una disminución importante en la diversidad de cepas de Mhyo en cerdos sacrificados (Michiels et al., 2017). En conjunto, estos resultados sugieren que solo el uso de las vacunas no es suficiente para eliminar, y probablemente para controlar, la infección por Mhyo. En realidad, la investigación sobre el desarrollo de vacunas se centra en el uso de aerosoles para la administración de vacunas (Feng et al., 2013) y vacunas de subunidades o vacunas de ADN (Marchioro et al., 2014; Virginio et al., 2014; Woolley et al., 2014; Maes et al., 2018).

Varios estudios realizados sobre la vacunación de las cerdas a final de la gestación concluyen que se reduce la colonización de los lechones al destete y una reducción de las lesiones pulmonares en estos lechones (Ruiz et al., 2003; Sibila et al., 2008; Arsenakis et al., 2019). Asimismo, se recomienda la vacunación de las cerdas nulíparas en granjas endémicamente infectadas para evitar la desestabilización de la inmunidad del rebaño de multíparas (Bargen, 2004).

Sin embargo, la eficacia sostenida en el tiempo de la vacunación ha sido ampliamente discutida por el hecho probado de que el grado de colonización del lechón en el momento del destete es irregular entre lotes (Fano et al., 2007). Este hecho se ha correlacionado directamente con el grado de lesión pulmonar en animales vacunados (Fano et al., 2007). En otras palabras, la eficacia de las vacunas depende de la prevalencia de la infección en el momento en el que se aplican.

### d) La aclimatación de las hembras de reposición

Con la información científica referente a la duración de la excreción de la bacteria tras la infección (Pieters et al., 2009), se están analizando nuevas estrategias de aclimatación que van desde la vacunación de las nulíparas hasta la exposición de las mismas al patógeno de campo (Garza-Moreno et al., 2018, 2019). En este sentido parece que la exposición a edades tempranas en las futuras cerdas reproductoras tendría un efecto epidemiológico beneficioso. De hecho, esta exposición temprana permitiría la reducción o eliminación de la excreción del patógeno por parte de las reproductoras, y, por tanto, se reduciría la colonización temprana del lechón. Esta circunstancia es clave para el control sostenido de la enfermedad a lo largo del tiempo.

### **3.4. RESPUESTA DEL ORGANISMO A LA VACUNACIÓN EN LA ESPECIE PORCINA**

A la importancia de la eficacia de las vacunas se suma la seguridad de éstas, que viene determinada en la ficha técnica de los productos biológicos. Habitualmente, esta documentación hace referencia a cambios en la TR y en algún caso a la aparición de un mayor o menor grado de inflamación en el punto de inoculación tras la aplicación de las vacunas. Esta información está amparada por la Directiva 2009/9/CE de la comisión de 10 de febrero de 2009 (Diario Oficial de la Unión Europea) por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios.

Sin embargo, en los últimos tiempos se están usando como indicadores de estrés o de bienestar de los animales unos marcadores biológicos medibles (Gutiérrez et al., 2008, 2009) que se producen en el organismo y que se denominan proteínas de fase aguda (PFA).

### **3.4.1. Qué son las proteínas de fase aguda (PFA)**

Las proteínas de fase aguda son proteínas sanguíneas sintetizadas durante la RFA frente a diversos estímulos como infección, inflamación, estrés, traumatismo o daño tisular (Petersen et al., 2004; Cerón et al., 2005). Durante la RFA, las concentraciones orgánicas de las PFA pueden variar y la medición de los niveles de PFA se utiliza ampliamente en la actualidad tanto en medicina humana como veterinaria.

La primera proteína de fase aguda se descubrió, hace más de 70 años (Tillet et al., 1930), fue la CRP, y en seres humanos se ha convertido en el analito más importante que proporciona información diagnóstica sobre la presencia de lesiones inflamatorias, sobre el pronóstico de la afección y sobre la respuesta al tratamiento (Pepys & Baltz, 1983; Gabay & Kushner, 1999). La CRP es una PFA mayor en el ser humano y su concentración aumenta más de 200 veces desde un nivel bajo normal, prácticamente insignificante. Otras proteínas de fase aguda conocidas son el amiloide A sérico (SAA), Hp,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (AGP), fibrinógeno (Fb),  $\alpha$ 1-antiproteasa (AP), ceruloplasmina (Cp) y proteína mayor de fase aguda porcina (Pig-MAP) (Thompson et al., 1992). De estas, el SAA es una proteína de fase aguda mayor, mientras que la Hp, AGP, Fb y AP son proteínas de fase aguda moderadas, puesto que su concentración sérica solo aumenta 2-3 veces durante la respuesta.

### **3.4.2. Funciones de las PFA**

El papel principal de la RFA es restaurar la homeostasis normal del organismo tras cualquiera de los estímulos mencionados anteriormente. En este sentido, la RFA se considera parte del sistema inmunitario innato que pone en marcha funciones como la leucocitosis, fiebre, quelación de zinc y hierro séricos y opsonización (Cerón et al., 2005).

## Introducción

---

En concreto, la principal función biológica de la Hp consiste en la prevención de la pérdida de hierro mediante la formación de complejos hemoglobina-hierro (Ceciliani et al., 2002; Petersen et al., 2004). Por lo tanto, la Hp desarrolla un efecto bacteriostático reduciendo el nivel de hierro disponible para los microorganismos (Petersen et al., 2004). La expresión de la Hp también se ha relacionado con la segregación de citocinas antiinflamatorias, concretamente la IL-10, mediante la interacción con CD163, un receptor captador de hemoglobina que solo está presente en células del linaje monocito/macrófago (Moestrup & Moller, 2004; Philippidis et al., 2004). No obstante, el mecanismo exacto utilizado por la Hp como modulador de la respuesta inmunitaria no está claro, ya que actúa como supresora de la proliferación de linfocitos en bovinos (Murata & Miyamoto, 1993) y como promotora de la diferenciación y proliferación de linfocitos B y T en ratones C57BL/6J deficientes en Hp (Huntoon et al., 2008).

Por su parte, la CRP se descubrió por primera vez en el suero de pacientes que sufrían una infección pneumocócica, como una sustancia que reaccionaba con el polisacárido C (Petersen et al., 2004). En la RFA, la CRP a menudo aumenta de forma más moderada que la Hp o el SAA, con un incremento de 1 a 10 veces (Petersen et al., 2004). Aunque algunos autores consideran que la CRP es una herramienta útil para diferenciar entre una infección bacteriana y una vírica, otros autores no pudieron detectar tales diferencias a causa de la variabilidad individual (Petersen et al., 2004). La CRP participa en la respuesta inmunitaria innata eliminando las bacterias y las células dañadas mediante activación del complemento y opsonización, activando la producción de citocinas inflamatorias por monocitos/macrófagos y evitando la migración de neutrófilos (Ceciliani et al., 2002; Petersen et al., 2004). Dado que la CRP es un componente de la

respuesta innata, puede considerarse como un indicador biológico temprano del estado de salud en las pjaras (Stevenson et al., 2006).

### **3.4.3. Dónde y cómo se evalúan las PFA**

Las muestras de suero son las muestras empleadas con mayor frecuencia, para medir los niveles de PFA tanto en animales de cría como de compañía. Se han utilizado con éxito otro tipo de muestras, como la saliva o el jugo de carne, para la medición de PFA en perros (Parra et al., 2005) y cerdos (Gutiérrez et al., 2008; 2009). La saliva presenta la ventaja de ser un método de muestra no invasivo, más fácil y menos estresante para los animales y el jugo de carne es una alternativa adecuada a las muestras de suero y sangre y simplifica el proceso de la recogida de muestras en el sacrificio.

La concentración de las PFA puede aumentar o disminuir tras un estímulo adecuado, lo que da lugar a la clasificación de las PFA en positivas, moderadas, menores o negativas en función de la variación de su concentración. Así, una PFA positiva puede mostrar un aumento de 100 a 1000 veces en su concentración en 1-2 días; una PFA moderada muestra un aumento de 5 a 10 veces en 2-3 días; y una PFA menor aumenta entre 0.5 y 1 veces. Las PFA negativas son aquellas que disminuyen tras un estímulo específico (Petersen et al., 2004; Cray et al., 2009; Eckersall & Bell, 2010).

### **3.4.4. Principales proteínas de fase aguda en la especie porcina**

El análisis de las PFA en la producción y medicina porcina se ha convertido en un área de creciente interés en relación con la evaluación de los niveles de estrés inmunológico relacionado con infecciones subclínicas y, por tanto, con el estado de salud y bienestar de la pjarra, y como marcador potencial de enfermedad en el sacrificio. Las infecciones subclínicas aumentan los niveles de citocinas proinflamatorias (Johnson,

1997) pero como estas son difíciles de medir y están en circulación solo durante un breve periodo de tiempo, es más adecuado monitorizar las PFA como marcadores para dicho estrés inmunológico. Ciertamente, se ha demostrado que la medición de la concentración sérica de la Hp identifica la presencia de infección subclínica que provoca una tasa de crecimiento reducida (Eurell et al., 1992) y hay indicios de que la media de los niveles de Hp de la granja puede estar relacionada con el estado de higiene de las instalaciones de producción (Lipperheide et al., 1998, 2000).

Recientemente, se midieron las PFA en suero porcino tras la estimulación de la respuesta de fase aguda con una inyección de trementina (Lampreave et al., 1994; Eckersall et al., 1996). Se identificó a la Hp y la CRP como proteínas de fase aguda mayores, con una concentración significativamente elevada después de 24 h, un valor máximo a las 48 h y retorno a los niveles normales al cabo de 6 días.

Como ocurre con la investigación de enfermedades en rumiantes, la RFA se utiliza cada vez más como una herramienta para cuantificar la respuesta a infección experimental en cerdos. La respuesta de la Hp en particular está proporcionando un valioso biomarcador y criterio de valoración para el estudio de infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Hall et al., 1992), *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* tipo D (Van Miert, 1996).

Como se ha comentado anteriormente, las PFA se han analizado en cerdos tras la exposición a estrés (Salamano et al., 2008) y después de infecciones bacterianas y víricas porcinas naturales (Chen et al., 2003; Parra et al., 2006) o experimentales (Francisco et al., 1996; Asai et al., 1999; Magnusson et al., 1999). Como sucede en otras especies, la inflamación o las enfermedades bacterianas tienden a desencadenar una RFA más



pronunciada con un mayor aumento de la concentración de las PFA que en las infecciones víricas, sin embargo, la infección con virus porcinos específicos, como el PCV-2 (Grau-Roma et al., 2009), produce una elevación de las PFA comparable a la observada en la inflamación o la infección por Mhyo (Parra et al., 2006).

En 2011 se publicó un interesante artículo sobre el papel de las PFA en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en cerdos. En dicho artículo, los autores mostraron combinaciones específicas de PFA que pueden ayudar a diagnosticar enfermedades infecciosas porcinas mejor que el análisis de PFA individuales (Heegaard et al., 2011).

Con respecto a las diferentes líneas genéticas porcinas, en varios estudios se observaron diferencias significativas entre estirpes genéticas para la CRP, la Pig-MAP y la transtiretina (Frank et al., 2005; Sutherland et al., 2006; Clapperton et al., 2005, 2007). Estos resultados ponen de manifiesto que las concentraciones de PFA deben ajustarse en función de factores como la edad, sexo, línea genética o rebaños individuales, siendo necesaria la determinación de un rango de referencia que permita un uso fiable de la medición de las PFA.

### **3.4.5. Las proteínas de fase aguda como marcadores biológicos del bienestar animal**

El estrés se considera el factor más importante a controlar en el bienestar animal. Hans Selye fue el primer autor que introdujo el concepto de estrés en 1936, como una respuesta no específica del organismo a estímulos externos, como patógenos o un entorno físico adverso (Selye, 1936). Actualmente en los sistemas de producción animal, algunos aspectos relacionados con el sistema de alojamiento y alimentación, así como cambios en la dieta y el transporte, se consideran causas de estrés que ponen en riesgo el bienestar

## Introducción

---

de los animales (Broom & Johnson, 1993). Asimismo, el estrés genera un riesgo para la homeostasis del animal, que da lugar a una respuesta inflamatoria que provoca inmunosupresión. La inmunosupresión favorece el desarrollo de enfermedades tales como la fiebre del transporte en ganado de engorde y la enfermedad de *Glässer* en cerdos. Además, un bienestar deficiente puede generar pérdidas en el rendimiento y la calidad de la carne. En los últimos tiempos, la población ha mostrado una preocupación creciente y significativa por el bienestar animal y los consumidores prefieren pagar precios más altos por aquellos productos cuya calidad esté garantizada.

El bienestar animal puede medirse mediante diferentes parámetros tales como la mortalidad en el rebaño, la presencia de lesiones, la evaluación conductual, las concentraciones plasmáticas de glucocorticoides y la frecuencia cardiaca (Broom & Johnson, 1993). Sin embargo, deben tenerse en cuenta un gran número de factores medidos para establecer una evaluación fiable (Grandin, 1997). Diferentes estudios han demostrado que las PFA son una herramienta útil para la evaluación del bienestar animal (Eckersall, 2000; Murata et al., 2004). Con la medición de las PFA puede hacerse un diagnóstico rápido antes de que aparezcan los signos conductuales y, como resultado de ello, aplicarse un tratamiento eficaz para evitar las pérdidas de rendimiento. Los cerdos son la especie sobre la que se han realizado más estudios sobre bienestar animal. Distintos estudios han mostrado que la carga de animales puede provocar una respuesta de PFA relacionada con el estrés del transporte (Murata et al., 1993; Saco et al., 2003). El estrés durante el transporte puede afectar a la calidad de la carne y, por consiguiente, al valor del producto comercial (Warris, 1998, 2003). En general, los niveles de PFA son extremadamente sensibles al transporte de cerdos y no solo se incrementan después del

viaje, sino también como resultado de la adaptación a unas instalaciones extrañas, los procedimientos de manipulación y la mezcla de animales (Salamano et al., 2008).

Tal como se ha descrito anteriormente, otros procedimientos que se realizan de forma rutinaria en las granjas son las vacunaciones, las cuales pueden comprometer el bienestar de los animales. En efecto, se ha demostrado que la vacunación causa diferentes grados de RFA, que se puede controlar midiendo las PFA presentes en esta fase (Eckersall et al., 2008). Las PFA se han propuesto como biomarcadores adecuados para controlar la respuesta inflamatoria (Heegaard et al., 2011) y el bienestar en general (Murata, 2007), lo que las convierte en parámetros ideales para la evaluación global del bienestar de los cerdos (Eckersall & Bell, 2010). Además, en las especies ovinas, se ha postulado que la monitorización de la respuesta inmediata posterior a la vacunación también podría brindar una información valiosa y temprana sobre la eficacia de las vacunas (Eckersall et al., 2008). En otro estudio, Destexhe et al. (2013) propusieron el uso de la CRP como un biomarcador potencial de vacunas para conejos en estudios de seguridad no clínicos. En la especie porcina específicamente un estudio en el que se monitorizaron los niveles de HP y Pig-MAP en cerdos durante toda la fase de engorde, reveló un incremento significativo únicamente de la HP a las 24 h después de la vacunación y la re-vacunación de Aujeszky (Saco et al., 2010). Por lo tanto, las PFA podrían usarse como biomarcadores para seleccionar el protocolo de vacunación que produce una menor reacción inflamatoria en el individuo y un mayor bienestar de los animales (Eckersall & Bell, 2010; Heegaard et al., 2011).

### 3.5. REFERENCIAS

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), 2019. España reduce un 7,2% el consumo de antibióticos en salud humana y un 32.4% las ventas de antibióticos veterinarios. Recuperado el 17 de marzo de 2020 de [www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/laaemps/2019](http://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/laaemps/2019)
- Akashi, K., Shimada, T., 2012. Alterations to a vaccination scheme to reduce interference by maternally derived antibodies. Proceedings of the 22<sup>nd</sup> IPVS Congress, 1001.
- Alexander, T., Thornton, K., Boon, G., Lysons, R., Gush, A., 1980. Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. Vet Rec 106, 114-119.
- Allan, G., McNeilly, F., McNair, I., Meehan, B., Marshall, M., Ellis, J., Lasagna, C., Boriosi, G., Krakowka, S., Reynaud, G., 2002. Passive transfer of maternal antibodies to PCV2 protects against development of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) experimental infections and a field study. Pig J 50, 59-67.
- Ameri-Mahabadi, M., Zhou, E.M., Hsu, W.H., 2005. Comparison of two swine *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. J Vet Diagn Invest 17, 61-64.
- Andraud, M., Rose, N., Grasland, B., Pierre, J.S., Jestin, A., Madec, F., 2009. Influence of husbandry and control measures on porcine circovirus type 2 (PCV-2) dynamics within a farrow-to-finish pig farm: a modelling approach. Prev Vet Med 92, 38-51.
- Armstrong, D., Bishop, S., 2004. Does genetics or little effects influence mortality in pmws. Proceedings of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress, 809.

- Arsenakis, I., Panzavolta, L., Michiels, A., Del Pozo Sacristán, R., Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., 2016. Efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination before and at weaning against experimental challenge infection in pigs. *BMC Vet Res* 12, 63.
- Arsenakis, I., Michiels, A., Schagemann, G., Gomez-Duran, C. O., Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., 2019. Effects of pre-farrowing sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on offspring colonisation and lung lesions. *Vet Rec* 184, 222.
- Asai, T., Mori, M., Okada, M., Uruno, K., Yazawa, S., Shibata, I., 1999. Elevated serum haptoglobin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 70, 143-148.
- Baccaro, M.R., Hirose, F., Umehara, O., Goncalves, L.C., Doto, D.S., Paixao, R., Shinya, L.T., 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. *Vet J* 172, 526-531.
- Bargen, L., 2004. A system response to an outbreak of enzootic pneumonia in grow/finish pigs. *Can Vet J* 45, 856-859.
- Beach, N.M., Meng, X.J., 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 164, 33-42.
- Bereiter, M., Young, T.F., Joo, H.S., Ross, R.F., 1990. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Vet Microbiol* 25, 177-192.

## Introducción

---

- Blanchard, B., Vena, M.M., Cavalier, A., Le Lannic, J., Gouranton, J., Kobisch, M., 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 30, 329-341.
- Bolin, S.R., Stoffregen, W.C., Nayar, G.P., Hamel, A.L., 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest* 13, 185-194.
- Bowman, AS., Nelson, S.W., Edwards, J.L., Hofer, C.C., Nolting, J.M., Davis, I.C., Slemmons, R.D., 2013. Comparative effectiveness of isolation techniques for contemporary Influenza A virus strains circulating in exhibition swine. *J Vet Diagn Invest* 25, 82-90.
- Boyd R.D., Zier-Rush C.E., Moeser A.J., Culbertson M., Stewart K.R., Rosero D.S., Patience J.F., 2019. Review: innovation through research in the North American pork industry. *Animal* 13, 2951-2966.
- Broom, D.M., Johnson, K.G., 1993. Stress and Animal Welfare. In: *Animal Behaviour Series*. Chapman and Hall, ISBN 0813816599, London.
- Browne, C., Loeffler, A., Holt, H.R., Chang, Y.M., Lloyd, D.H., Nevel, A., 2017. Low temperature and dust favour in vitro survival of *Mycoplasma hyopneumoniae*: time to revisit indirect transmission in pig housing. *Lett Appl Microbiol* 64, 2-7.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C., 2000. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Vet Rec* 146, 530 - 532.

- Calsamiglia, M., Collins, J.E., Pijoan, C., 2000. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. *Vet Microbiol* 76, 299-303.
- Ceciliani, F., Giordano, A.; Spagnolo, V., 2002. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein and peptide letters* 9, 211-223.
- Cerón, J.J., Eckersall, P.D., Martinez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats; current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Path* 34, 85-99.
- Chae, C., 2012. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *Vet J* 194, 151-157.
- Charreyre, C., Beseme, S., Brun, A., Bublot, M., Joisel, F., Lapostolle, B., Sierra, P., Vaganay, A., 2005. Vaccination strategies for the control of circoviral diseases in pigs. *Proceedings of the ESVV, International Conf. on Animal Circoviruses and Associated Diseases*, 26-30.
- Chen, H.H., Lin, J.H., Fung, H.P., Ho, L.L., Yang, P.C., Lee, W.C., Lee, Y.P., Chu, R.M., 2003. Serum acute phase proteins and swine health status. *Can J Vet Res* 67, 283-290.
- Clapperton, M., Bishop, S.C., Glass, E.J., 2005. Innate immune traits differ between Meishan and Large White pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 104, 131-144.
- Clapperton, M., Bishop, S.C., Piñeiro, M., Campbell, F.M., Glass, E.J., 2007. The association between plasma levels of acute phase proteins, haemoglobin, alpha-1 acid glycoprotein (AGP), Pig-MAP, transthyretin and serum amyloid A (SAA) in Large White and Meishan pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 119, 3-4, 303-309.

## Introducción

---

Clark, L.K., Armstrong, C.H., Knox, K., Mayrose, V.B., 1991. The effect of all-in/all-out management on pigs from a herd with enzootic pneumonia. *Vet Med*, 946-51.

COVID-19-US: gestión de los animales en granja ante el cierre de las plantas procesadoras. Recuperado el 29 de abril de 2020 de <https://www.3tres3.com/ultima-hora/us-gestion-de-los-animales-en-granja-ante-el-cierre-de-las-plantas-44809>

Cray, C., Zaias, J. Altman, N. H., 2009. Acute phase response in animals: a review. *Comparative medicine* 59, 517-526.

De Castro, L.A., Rodrigues Pedroso, T., Kuchiishi, S.S., Ramenzoni, M., Kich, J.D., Zaha, A., Henning Vainstein, M., Bunselmeyer Ferreira, H., 2006. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet Microbiol* 116, 258-269.

De Paz, X., 2015. PRRS cost for the European swine industry. Recuperado el 10 de marzo de 2020 de <https://www.pig333.com/what-the-experts-say/prrs-cost-for-the-european-swine-industry-10069/>

DeBey, M.C., Ross, R.F., 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* 62, 5312-5318.

Dewey, C., 2008. The use of epidemiology to enhance production animal research. *Prev Vet Med* 86, 244-249.

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), 2020. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Recuperado el 8 de marzo de 2020 de [https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/73666448x/sb397r25n/0z709c25b/livestock\\_poultry.pdf](https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/73666448x/sb397r25n/0z709c25b/livestock_poultry.pdf)



Destexhe, E., Prinsen, M.K., Schöll, I.V., Kuper, C.F., Garçon, N., Veenstra, S., Segal, L., 2013.

Evaluation of C-reactive protein as an inflammatory biomarker in rabbits for vaccine nonclinical safety studies. *J Pharmacol and Toxicol Meth* 68, 367-373.

DIRECTIVA 2009/9/CE DE LA COMISIÓN de 10 de febrero de 2009 que modifica la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. *Diario Oficial de la Unión Europea* de 14/02/2009. L 44/10 ES

Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Romalis, L.F., Nicholls, P.J., Taylor, V., Chin, J., 1997. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. *Aust Vet J* 75, 504-511.

Dykhuis Haden, C., Painter, T., Fangman, T., Holtkamp, D., 2012. Assessing production parameters and economic impact of swine influenza, PRRS and *Mycoplasma hyopneumoniae* on finishing pigs in a large production system. *Proceedings of the 43<sup>rd</sup> AASV Annual Meeting*, 75-76.

Eckersall, P.D., Bell, R., 2010. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* 185, 23-27.

Eckersall, P.D., 2000. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. *Irish Vet J* 53, 307-311.

Eckersall, P.D., Saini, P.K., McComb, C., 1996. The acute-phase response of acid-soluble glycoprotein, alpha (1)-Acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and c-reactive protein, in the pig. *Vet Immunol Immunopathol* 51, 377-385.

- Eckersall, P.D., Lawson, F.P., Kyle, C.E., Waterston, M., Bence, L., Stear, M.J., Rhind, S.M. 2008. Maternal undernutrition and the ovine acute phase response to vaccination. *BMC Vet Res* 15, 1.
- Eurell, T.E., Bane, D.P., Hall W.F., Scheaffer D.J., 1992. Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs. *Can J Vet Res* 56, 6-9.
- Fablet, C., Marois, C., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N., 2010. Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Vet Microbiol* 143, 238-245.
- Fablet, C., Marois-Crehan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N., 2012. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-tofinish pig herds: a cross-sectional study. *Vet Microbiol* 157, 152-163.
- Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S.B., Saalmuller, A., Elbers, K., 2008. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* 26, 1488-1499.
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., 2005. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Can J Vet Res* 69, 223-228.
- 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.
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., Deen, J., 2012. Longitudinal assessment of two *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays in challenged and contact-exposed pigs. *J Vet Diagn Invest* 24, 383-387.

- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J Virol* 78, 6297-6303.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J Virol* 77, 11232-11243.
- Feng, Z.X., Wei, Y.N., Li, G.L., Lu, X.M., Wan, X.F., Pharr, G.T., Wang, Z.W., Kong, M., Gan, Y., Bai, F.F., Liu, M.J., Xiong, Q.Y., Wu, X.S., Shao, G.Q., 2013. Development and validation of an attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol vaccine. *Vet Microbiol* 167, 417-424.
- Figueras, S., Callén, A., Sala, V., Hernández I., Rodríguez, V., 2018c. Case Report: Impact of PCV2 reproductive stock vaccination on detection of virus in placental umbilical cords serum (PUCS). *Proceedings of the 25<sup>th</sup> IPVS congress*, 552.
- Figueras, S., Cos, X., Picó, L., Callén, A., Hernández, I., Rodríguez, V., 2018a. 1<sup>st</sup> case report: Reproductive performance improvement after PCV2 sow vaccination in Spain. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> ESPHM*, 515.
- Figueras, S., Cos, X., Picó, L., Callén, A., Hernández, I., Rodríguez, V., 2018b. 2<sup>nd</sup> case report: Reproductive performance improvement after PCV2 sow vaccination in Spain. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> ESPHM*, 517.

- Fort, M., Sibila, M., Allepuz, A., Mateu, E., Roerink, F., Segalés, J., 2008. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 26, 1063-1071.
- Fort, M., Sibila, M., Pérez-Martin, E., Nofrarías, M., Mateu, E., Segalés, J., 2009. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine* 27, 4031-4037.
- Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarias, M., Segalés, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Vet J* 184, 326-333.
- Fraile, L., Grau-Roma, L., Sarasola, P., Sinovas, N., Nofrarías, M., López-Jimenez, R., López-Soria, S., Sibila, M., Segalés, J., 2012a. Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: Improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine* 30, 1986-1992.
- Fraile, L., Sibila, M., Nofrarías, M., López-Jimenez, R., Huerta, E., Llorens, A., López-Soria, S., Pérez, D., Segalés, J., 2012b. Effect of sow and piglet porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on piglet mortality, viraemia, antibody titre and production parameters. *Vet Microbiol* 161, 229-234.
- Francisco, C.J., Shryock, T.R., Bane, D.P., Unverzagt, L., 1996. Serum haptoglobin concentration in growing swine after intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* type D. *Can J Vet Res* 20, 222-227.

- Frank, J.W., Mellencamp, M.A., Carroll, J.A., Boys, R.D., Allee, G.L., 2005. Acute feed intake and acute-phase responses following a lipopolysaccharide challenge in pigs from two dam lines. *Vet Immunol Immunopathol* 107, 179-187.
- Franzo, G., Segalés, J., 2018. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. *Plos one* 13, (12): e0208585.
- Gabay, C., Kushner I., 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340, 448-454.
- Garza-Moreno, L., Segalés, J., Pieters, M., Romagosa, A., Sibila, M., 2018. Acclimation strategies in gilts to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet Microbiol* 219, 23-29.
- Garza-Moreno, L., Pieters, M., López-Soria, S., Carmona, M., Krejci, R., Segalés, J., Sibila, M., 2019. Comparison of vaccination protocols against *Mycoplasma hyopneumoniae* during the gilt acclimation period. *Vet Microbiol* 229, 7-13.
- Gerber, P.F., Garrocho, F.M., Lana, A.M., Lobato, Z.I., 2011. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *Vet J* 188, 240-242.
- Gerber, P.F., Garrocho, F.M., Lana, A.M., Lobato, Z.I., 2012. Fetal infections and antibody profiles in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Can J Vet Res* 76, 38-44.
- Gomes Neto, J.C., Strait, E.L., Raymond, M., Ramirez, A., Minion, F.C., 2014. Antibody responses of swine following infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* and *M. flocculare*. *Vet Microbiol* 174, 163-171.

- Goubier, A., Chapat, L., Toma, S., Piras, F., Joisel, F., Maurin-Bernaude, L., Charreyre, C., Andreoni, C., Juillard, V., 2008. Transfer of maternal immunity from sows vaccinated against PCV2 with Circovac to their piglets. Proceeding of the 18<sup>th</sup> IPVS Congress, 16.
- Grandin, T., 1997. Assessment of stress during handling and transport. *J Anim Sci* 75, 249-257.
- Grau-Roma, L., Heegaard, P.M., Hjulsager, C.K., Sibila, M., Kristensen, C.S., Allepuz, A., Piñeiro, M.; Larsen, L.E., Segalés, J., Fraile, L., 2009. Pig-major acute phase protein and haptoglobin serum concentrations correlate with PCV2 viremia and the clinical course of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol* 138, 53-61.
- Grosse Beilage, E., Rohde, N., Krieter, J., 2009. Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Prev Vet Med* 88, 255-263.
- Gutiérrez, A.M.; Martínez-Subiela, S.; Eckersall, P.D., Cerón, J.J., 2009. C-reactive protein quantification in porcine saliva: a minimally invasive test for pig health monitoring. *Vet J* 181, 261-265.
- Gutiérrez, A.M.; Martínez-Subiela, S.; Montes, A.; Parra, M.D., Cerón, J.J., 2008. C-reactive protein measurements in meat juice of pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 122, 250-255.
- Ha, Y., Lee, Y.H., Ahn, K.K., Kim, B., Chae, C., 2008. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Vet Pathol* 45, 842-848.

- Haake, M., Palzer, A., Rist, B., Weissenbacher-Lang, C., Fachinger, V., Eggen, A., Ritzmann, M., Eddicks, M., 2014. Influence of age on the effectiveness of PCV2 vaccination in piglets with high levels of maternally derived antibodies. *Vet Microbiol* 168, 272-280.
- Hall, W.F., Eurell, T.E., Hansen, R.D., Herr, L.G., 1992: Serum haptoglobin concentration in swine naturally or experimentally infected with *actinobacillus-pleuropneumoniae*. *J Am Vet Med Ass* 201, 1730-1733.
- Harris, D.L., 2000. Multi-site pig production. Book. ©2000 Iowa State University Press.
- Hauray, K., Delisle, G., 2013. Effect of mass vaccination of Ingelvac CircoFLEX® on reproductive performance of sows. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> ESPHM*, 113.
- Heegaard, P.M., Stockmarr, A., Piñeiro, M., Carpintero, R., Lampreave, F., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J., Gruys, E., Sorensen, N.S., 2011. Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs. *Vet Res* 42, 50.
- Holtkamp, D.J., Kliebenstein, J.B., Neumann, E., Zimmerman, J.J., Rotto, H., Yoder, T.k., Wang, C., Yeske, P., Mowrer, C.L., and Haley, C.A., 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod* 21, 72.
- Horlen, K.P., Schneider, P., Anderson, J., Nietfeld, J.C., Henry, S.C., Tokach, L.M., Rowland, R.R., 2007. A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: clinical features and association with the PCV2b genotype. *J Swine Health Prod* 15, 270-278.

## Introducción

---

- Huntoon, K.M., Wang, Y., Eppolito, C.A., Barbour, K.W., Berger, F.G., Shrikant, P.A., Baumann, H., 2008. The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *J Leukoc Biol* 84, 170-181.
- Informe SICE – Evolución del Comercio Exterior del Sector Porcino Español –AÑO 2019 – (Febrero 2020).
- Johnson R.W., 1997. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines; an integrated view. *J. Anim. Sci* 75, 1244-1255.
- Johnson, C.S., Joo, H.S., Direksin, K., Yoon, K.J., Choi, Y.K., 2002. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 14, 507–512.
- Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segalés, J., Allan, G.M., 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet Immunol Immunopathol* 136, 185-193.
- Kixmöller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmüller, A., Elbers, K., Fachinger, V., 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 26, 3443-51.
- Knox RV., 2014. Impact of swine reproductive technologies on pig and global food production. *Adv Exp Med Biol* 752, 131-60.
- Kobisch, M., Blanchard, B., Le Potier, M.F., 1993. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet Res* 24, 67-77.



- 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.
- Lampreave, F., Gonzalez-Ramon, N., Martinez Ayensa, S., Hernandez, M.A., Lorenzo, H. K., Garcia Gil, A., Pineiro, A., 1994. Characterisation of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis* 15, 672-676.
- Lebret, A., Boulbria, G., Berton, P., Moalic, P.Y., Le Guennec, J., Bouchet, F., Auvigne, V., Normand, V., 2019. Monitoring PRRSV-1 in suckling piglets in an endemic herd using reverse transcriptase quantitative real time polymerase chain reaction: comparison of the rate of detection in serum and oral fluid samples and evaluation of pooling. *Porcine Health Manag* 19, 5-8.
- Lefebvre, D.J., Meerts, P., Costers, S., Misinzo, G., Barbe, F., Van Reeth, K., Nauwynck, H.J., 2008. Increased porcine circovirus type 2 replication in porcine leukocytes in vitro and in vivo by concanavalin A stimulation. *Vet Microbiol* 132, 74-86.
- Leon, E.A., Madec, F., Taylor, N.M., Kobisch, M., 2001. Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. *Vet Microbiol* 78, 331-341.
- Lipperheide, C., Rabe, M., Knura, S., Petersen, B., 2000. Effects of farm hygiene on blood chemical variables in fattening pigs. *Tierarztl. Umschau* 55, 30-36.
- Lipperhiede, C., Diepers, N., Lampreave, F., Alava, M., Petersen, B., 1998. Nephelometric determination of haptoglobin plasma concentrations in fattening pigs. *J. Vet. Med. A* 45, 543-550.

- López-Soria, S., Nofrarías, M., Calsamiglia, M., Espinal, A., Valero, O., Ramírez-Mendoza, H., Mínguez, A., Serrano, J.M., Marin, O., Callén, A., Segalés, J., 2011. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) clinical expression under field conditions is modulated by the pig genetic background. *Vet Microbiol* 149, 352-357.
- López-Soria, S., Segalés, J., Rose, N., Vinas, M., Blanchard, P., Madec, F., Jestin, A., Casal, J., Domingo, M., 2005. An exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Prev Vet Med* 69, 97-107.
- Madec, F., Eveno, E., Morvan, P., Hamon, L., Blanchard, P., Cariolet, R., Amenna, N., Morvan, H., Truong, C., Mahé, D., 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest Prod Sci* 63, 223-233.
- Madec, F., Rose, N., Eveno, E., Morvan, P., Larour, G., Jolly, J., Le Diguerher, G., Cariolet, R., Le Dimna, M., Blanchard, P., 2001. PMWS: on-farm observations and preliminary analytic epidemiology. *Proceedings of the ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and Primates Meeting*, 86-87.
- Madson, D.M., Ramamoorthy, S., Kuster, C., Pal, N., Meng, X.-J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2008. Characterization of shedding patterns of porcine circovirus types 2a and 2b in experimentally inoculated mature boars. *J Vet Diagn Invest* 20, 725-734.
- Maes, D., Segalés, 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. *Transboundary and emerging diseases*, 65 Suppl 1, 110–124.
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., De Kruif, A., 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q* 18, 104-109.
- Magnusson, U., Wilkie, B., Artursson, K., Mallard, B., 1999. Interferon-alpha and haptoglobin in pigs selectively bred for high and low immune response and infected with *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet Immunol Immunopathol* 68, 2-4, 131-137.
- Makhanon, M., Tummaruk, P., Thongkamkoon, P., Thanawongnuwech, R., Prapasarakul, N., 2012. 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. *Trop Anim Health Prod* 44, 313-318.
- Marchioro, S.B., Fisch, A., Gomes, C.K., Jorge, S., Galli, V., Haesebrouck, F., Maes, D., Dellagostin, O., Conceicao, F.R., 2014. Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens fused to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin LT<sub>B</sub>. *Vet Microbiol* 173, 166-171.
- Marois, C., Le Carrou, J., Kobisch, M., Gautier-Bouchardon, A.V., 2007. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet Microbiol* 120, 96-104.

- Martelli, P., Ardigo, P., Ferrari, L., Morganti, M., De Angelis, E., Bonilauri, P., Luppi, A., Guazzetti, S., Caleffi, A., Borghetti, P., 2013. Concurrent vaccinations against PCV2 and PRRSV: Study on the specific immunity and clinical protection in naturally infected pigs. *Vet Microbiol* 162, 558-571.
- Martelli, P., Ferrari, L., Morganti, M., De Angelis, E., Bonilauri, P., Guazzetti, S., Caleffi, A., Borghetti, P., 2011. One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *Vet Microbiol* 149, 339-351.
- Mateusen, B., Maes, D., Van Goubergen, M., Verdonck, M., de Kruif, A., 2002. Effectiveness of treatment with lincomycin hydrochloride and/or vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* for controlling chronic respiratory disease in a herd of pigs. *Vet Rec* 151, 135-140.
- McKeown, N.E., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D.K., Elvinger, F., Fenaux, M., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2005. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 1347-1351.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79, 2171-2179.
- Meng, X.J., 2013. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2): Pathogenesis and Interaction with the Immune System. *Annu. Rev Anim Biosci* 1, 43-64.

- Merialdi, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Luppi, A., Gozio, S., Pozzi, P., Spaggiari, B., Martelli, P., 2012. 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, 234-239.
- Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F., Maes, D., 2006. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non vaccinated populations. *Vaccine* 24, 7081-7086.
- Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Haesebrouck, F., Maes, D., 2011. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *Vet J* 187, 388-392.
- Michiels, A., Vranckx, K., Piepers, S., Del Pozo Sacristán, R., Arsenakis, I., Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., 2017. Impact of diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains on lung lesions in slaughter pigs. *Vet Res* 48, 2.
- Miller, E.R., Ullrey, D.E., 1987. The pig as a model for human nutrition. *Annu Rev Nutr* 7, 361-382.
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), 2020. Recuperado el 9 de marzo de 2020 de <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/>
- Moestrup, S.K., Moller, H.J., 2004. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Annals of Medicine* 36, 347-354.
- Morris, C.R., Gardner, I.A., Hietala, S.K., Carpenter, T.E., 1995a. Enzootic pneumonia: comparison of cough and lung lesions as predictors of weight gain in swine. *Can J Vet Res* 59, 197-204.

## Introducción

---

- Morris, C.R., Gardner, I.A., Hietala, S.K., Carpenter, T.E., Anderson, R.J., Parker, K.M., 1995b. Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Prev Vet Med* 21, 323-337.
- Murata, H., 2007. Stress and acute phase protein response: An inconspicuous but essential linkage. *Vet J* 173, 473-4.
- Murata, H., Miyamoto, T., 1993. Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. *British Vet J* 149, 277-283
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* 168, 28-40.
- Nathues, H., Chang, Y.M., Wieland, B., Rechter, G., Spargser, J., Rosengarten, R., Kreienbrock, L., Grosse Beilage, E., 2014. Herd-level risk factors for the seropositivity to *Mycoplasma hyopneumoniae* and the occurrence of enzootic pneumonia among fattening pigs in areas of endemic infection and high pig density. *Transbound Emerg Dis* 61, 316-328.
- Nathues, H., Spargser, J., Rosengarten, R., Kreienbrock, L., Grosse Beilage, E., 2012. Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. *Vet J* 193, 443-447.
- Nathues, H., Woeste, H., Doehring, S., Fahrion, A.S., Doherr, M.G., Beilage, E., 2013. Herd specific risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Vet Scand* 55, 30.

- Oh, Y., Seo, H.W., Han, K., Park, C., Chae, C., 2012. Protective effect of the maternally derived porcine circovirus type 2 (PCV2)-specific cellular immune response in piglets by dam vaccination against PCV2 challenge. *J Gen Virol* 93, 1556-1562.
- Oh, Y., Seo, H.W., Park, C., Chae, C., 2014. Comparison of sow and/or piglet vaccination of 3 commercial porcine circovirus type 2 (PCV2) single-dose vaccines on pigs under experimental PCV2 challenge. *Vet Microbiol* 172, 371-380.
- O'Neill, K.C., Hemann, M., Giménez-Lirola, L.G., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. Vaccination of sows reduces the prevalence of PCV-2 viraemia in their piglets under field conditions. *Vet Rec* 171, 425.
- Opriessnig, T., Fenaux, M., Thomas, P., Hoogland, M.J., Rothschild, M.F., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006a. Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Vet Pathol* 43, 281-293.
- Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19, 591-615.
- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Ramamoorthy, S., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2010. Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Vet Microbiol* 142, 177-183.
- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J.K., Juhan, N.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2009b. Difference in severity of porcine

circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *J Anim Sci* 87, 1582-1590.

Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004a. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 41, 624-640.

Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., Deen, J., 2010. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet Microbiol* 145, 198-208.

Park, C., Seo, H.W., Han, K., Chae, C., 2014. Comparison of four commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines administered to pigs challenged with PCV2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus at 17 weeks postvaccination to control porcine respiratory disease complex under Korean field conditions. *Clin Vaccine Immunol* 21, 399-406.

Park, J.S., Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Lim, J.K., Kim, S.H., Chae, C., 2005. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol* 132, 139-144.

Parra, M.D., Fuentes, P., Tecles, F., Martínez-Subiela, S., Martínez, J.S., Muñoz, A., Cerón, J.J., 2006. Porcine acute phase protein concentrations in different diseases in field conditions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53, 488-493.

Parra, M.D., Tecles, F., Martínez-Subiela, S., Cerón, J.J., 2005. C-reactive protein measurement in canine saliva. *J Vet Diagn Invest* 17, 139-144.



- Pejsak, Z., Kusior, G., Pomorska-Mól, M., Podgórska, K., 2012. Influence of long-term vaccination of a breeding herd of pigs against PCV2 on reproductive parameters. *Pol J Vet Sci* 15, 37-42.
- Pejsak, Z., Podgorska, K., Truszczyński, M., Karbowski, P., Stadejek, T., 2010. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33, 1-5.
- Pepys, M.B., Baltz, M.L., 1983. Acute phase proteins with special reference to CRP and related proteins (pentraxins) and serum amyloid A. *Adv. Immunol* 34, 141-221.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35, 163-187.
- Philippidis, P., Mason, J.C., Evans, B.J., Nadra, I., Taylor, K.M., Haskard, D.O., Landis, R.C., 2004. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and hemoxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circulation Research* 94, 119-126.
- Pieters, M., Fano, E., 2016. *Mycoplasma hyopneumoniae* management in gilts. *Vet Rec* 178, 122-123.
- 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. *Can J Vet Res* 74, 157-160.

- Pieters, M., Pijoan, C., Fano, E., Dee, S., 2009. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Vet Microbiol* 134, 261-266.
- Pieters, M., Rovira, A., 2013. Comparison of various samples types for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in recently infected pigs. Proceedings of the Allen D. Lemman Swine Conference.
- Quilles, A., Otal, J., Cubero, M.J., 2013. Profilaxis vacunal en ganado porcino. Recuperado el 12 de marzo de 2020 de [https://www.produccionanimal.com/profilaxis-vacunal-en-ganado-porcino/#Quiles A Otal J y Cubero Ma J](https://www.produccionanimal.com/profilaxis-vacunal-en-ganado-porcino/#Quiles_A_Otal_J_y_Cubero_Ma_J)
- Rabobank. 2020. Recuperado el 14 de marzo de 2020 de <https://research.rabobank.com/far/en/sectors/animal-protein/pork-quarterly-q1-2020.html>
- Rautiainen, E., Oravainen, J., Virolainen, J.V., Tuovinen, V., 2001. Regional eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from pig herds and documentation of freedom of the disease. *Acta Vet Scand* 42, 355-364.
- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 1094-1156.
- Rodríguez-Arrijoja, G.M., Segalés, J., Domingo, M., Plana-Duran, J., 2003. Lack of PCV-2 infection in non-porcine species in Spain. *Vet Rec.* 153:371-337.
- Roos, L.R., 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. *Vet Microbiol* 184, 51-58.

- Rose, N., Abhervé-Guéguen, A., Le Diguerher, G., Eveno, E., Jolly, J.-P., Blanchard, P., Oger, A., Jestin, A., Madec, F., 2005. Effect of the Pietrain breed used as terminal boar on Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in the offspring in four PMWS-affected farms. *Livest Prod Sci* 95, 177-186.
- Rose, N., Eveno, E., Grasland, B., Nignol, A.-C., Oger, A., Jestin, A., Madec, F., 2009. Individual risk factors for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs: a hierarchical Bayesian survival analysis. *Prev Vet Med* 90, 168-179.
- Rose, N., Opriessnig, T., Grasland, B., Jestin, A., 2012. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 164, 78-89.
- Royer, R.L., Nawagitgul, P., Halbur, P.G., Paul, P.S., 2001. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *J Swine Health Prod* 9, 281-284.
- Ruiz, A., Utrera, V., Pijoan, C., 2003. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* sow vaccination on piglet colonization at weaning. *J Swine Health Prod* 11, 131-135.
- Saco, Y., Fraile, L.J., Gimenez, M., Pato, R., Montoya, M., Bassols, A., 2010. Haptoglobin serum concentration is a suitable biomarker to assess the efficacy of a feed additive in pigs. *Animal* 4, 1561-7.
- Saco, Y., Docampo, M., Fàbrega, E., Manteca, X., Diestre, A., Lampreave, F., Bassols, A., 2003. Effect of transport stress on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Animal Welfare* 12, 403-409.
- Saha, D., Lefebvre, D., Van Doorselaere, J., Atanasova, K., Barbé, F., Geldhof, M., Karniyuchuk, U.U., Nauwynck, H.J., 2010. Pathological and virological outcome in mid-gestational

## Introducción

---

porcine foetuses after experimental inoculation with PCV2a and PCV2b. *Vet Microbiol* 145, 62–68.

Salamano, G., Mellia, E., Candiani, D., Ingravalle, F., Bruno, R., Ru, G., Doglione, L., 2008. Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *Vet J* 177, 110-115.

Sánchez, R.E., Jr., Meerts, P., Nauwynck, H.J., Ellis, J.A., Pensaert, M.B., 2004. Characteristics of porcine circovirus-2 replication in lymphoid organs of pigs inoculated in late gestation or postnatally and possible relation to clinical and pathological outcome of infection. *J Vet Diagn Invest* 16, 175-185.

Sánchez, R.E., Meerts, P., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 2003. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet. Microbiol* 95, 15–25.

Sánchez, R.E., Nauwynck, H.J., McNeilly, F., Allan, G.M., Pensaert, M.B., 2001. Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet Microbiol* 83, 169–176.

Sanmartin, J., 2017. La Granja 4.0 El futuro de la producción porcina. Recuperado el 11 de marzo de 2020 de <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/granja-futuro-produccion-porcina-t41360.htm>

Sarradell, J., Andrada, M., Ramírez, A.S., Fernández, A., Gómez-Villamandos, J.C., Jover, A., Lorenzo, H., Herraiz, P., Rodríguez, F., 2003. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Pathol* 40, 395-404.

- Scortti, M., Prieto, C., Simarro, I., Castro, J.M., 2006. Reproductive performance of gilts following vaccination and subsequent heterologous challenge with European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 66, 1884-93.
- Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 164, 10-19.
- Segalés, J., 2015. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Rev Vaccines* 14, 473-487.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6, 119-142.
- Segalés, J., Domingo M., 2003. Diagnosis, prevention and control of PCV2- associated diseases. *Proceedings of the 23<sup>th</sup> AASV meeting*, 371-376
- Segalés, J., Gordon, M., Mariano, D., 2012. In: Jeffrey, J.Z., Locke, A.K., Alejandro, R., Kent, J.S., Gregory, W.S. (Eds.), *Porcine Circoviruses in Diseases of Swine*. 10<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, 405-417
- Segalés, J., Urniza, A., Alegre, A., Bru, T., Crisci, E., Nofrarías, M., Lopez-Soria, S., Balasch, M., Sibila, M., Xu, Z., Chu, H.J., Fraile, L., Plana-Duran, J., 2009. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine* 27, 7313-7321.
- Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138, 32.

- Seo, H.W., Han, K., Park, C., Chae, C., 2014. Clinical, virological, immunological and pathological evaluation of four porcine circovirus type 2 vaccines. *Vet J* 200, 65-70.
- Shang, S.B., Jin, Y.L., Jiang, X.T., Zhou, J.Y., Zhang, X., Xing, G., He, J.L., Yan, Y., 2009. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Mol. Immunol* 46, 327–334.
- Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe, Y., Hidejima, I., 2003. PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J Vet Med Sci* 65, 405-408.
- Sibila, M., Bernal, R., Torrents, D., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia, M., Segalés, J., 2008. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Vet Microbiol* 127, 165-170.
- Sibila, M., Calsamiglia, M., Vidal, D., Badiella, Ll., Aldaz, A., Jensen, J.C., 2004. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Can J Vet Res* 68, 12–18
- Sibila, M., Fort, M., Nofrarias, M., Pérez de Rozas, A., Galindo-Cardiel, I., Mateu, E., Segalés, J., 2012. Simultaneous porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-inoculation does not potentiate disease in conventional pigs. *J Comp Pathol* 147, 285-295.
- Sibila, M., Fraile, L., Ticó, G., López-Soria, S., Nofrarias, M., Huerta, E., Llorens, A., López-Jimenez, R., Pérez, D., Segalés, J., 2013. Humoral response and colostral antibody

transfer following 'one-dose' pre-mating vaccination of sows against porcine circovirus type-2. *Vet J* 197, 881-883.

Sibila, M., Nofrarias, M., López-Soria, S., Segalés, J., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia, M., 2007a. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. *Vet Microbiol* 121, 352-356.

Sibila, M., Nofrarias, M., López-Soria, S., Segalés, J., Valero, O., Espinal, A., Calsamiglia, M., 2007b. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet Microbiol* 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, 221-231.

Simionatto, S., Marchioro, S.B., Maes, D., Dellagostin, O.A., 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. *Vet Microbiol* 165, 234-242.

Sorden, S., 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemicwasting syndrome. *J. Swine Health and Prod.*8, 136.

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, 23-34.

Sponheim, A., Alvarez, J., Fano, E., Schmaling, E., Dee, S., Hanson, D., Wetzell, T., Pieters M., 2020. Comparison of the sensitivity of laryngeal swabs and deep tracheal catheters

for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally and naturally infected pigs early and late after infection. *Vet Microbiol* 241, 108500.

Stevenson, L.S., McCullough, K., Vincent, I., Gilpin, D.F., Summerfield, A., Nielsen, J., McNeilly, F., Adair, B.M., Allan, G.M., 2006. Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunol* 19, 189-195.

Strait, E.L., Madsen, M.L., Minion, F.C., Christopher-Hennings, J., Dammen, M., Jones, K.R., Thacker, E.L., 2008. Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Clin Microbiol* 46, 2491-2498.

Straw, B.E., Tuovinen, V.K., Bigras-Poulin, M., 1989. Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. *J Am Vet Med Assoc* 195, 1702-1706.

Sunaga, F., Tsuchiaka, S., Kishimoto, M., Aoki, H., Kakinoki, M., Kure, K., Okumura, H., Okumura, M., Okumura, A., Nagai, M., Omatsu, T., Mizutani, T., 2020. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases. *J Vet Med Sci* 82, 217-223.

Sutherland, M.A., Niekamp, S.R., Rodríguez-Zas, S.L., Salak-Johnson, J.L., 2006. Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds. *J Anim Sci* 84, 588-596.

Tajima, M., Yagihashi, T., 1982. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect Immun* 37, 1162-1169.



- Takahagi, Y., Toki, S., Nishiyama, Y., Morimatsu, F., Murakami, H., 2010. Differential effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2 genotypes at Japanese pig farms. *J Vet Med Sci* 72, 35-41.
- Tamiozzo, P., Zamora, R., Lucchesi, P.M., Estanguet, A., Parada, J., Carranza, A., Camacho, P., Ambrogi, A., 2015. MLVA typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins and field strains. *Vet Rec Open* 2, e000117.
- Tassis, P.D., Papatsiros, V.G., Nell, T., Maes, D., Alexopoulos, C., Kyriakis, S.C., Tzika, E.D., 2012. Clinical evaluation of intradermal vaccination against porcine enzootic pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*). *Vet Rec* 170, 261.
- Thacker, B., Francisco, C., Schlueter, R., 2008. Circumvent PCV vaccine: performance evaluation and serological studies update. Proceedings of the 39<sup>th</sup> AASV Annual Meeting, 1536-1548.
- Thacker, E.L., 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Anim Health Res Rev* 5, 317-320.
- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R., Thacker, B.J., 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* 37, 620-627.
- Thacker, E.L., Minion, F.C., 2012. Mycoplasmosis, In: Diseases of swine, 10th ed. Wiley-Blackwell, pp. 779-797.
- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Janke, B.H., 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol* 39, 2525-2530.

## Introducción

---

- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Kuhn, M., Hawkins, P.A., Waters, W.R., 2000. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *Am J Vet Res* 61, 1384-1389.
- Thompson, D., Milford-Ward, A., Whicher, J.T., 1992. The value of acute phase protein measurements in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 29, 123 - 131.
- Thrusfield, M., 1995. *Veterinary Epidemiology*. Blackwell, Oxford, 483.
- Tillett, W.S., Francis, T., 1930. Serological reactions in pneumonia with non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 52, 561-571.
- Trible, B.R., Ramirez, A., Suddith, A., Fuller, A., Kerrigan, M., Hesse, R., Nietfeld, J., Guo, B., Thacker, E., Rowland, R.R., 2012. Antibody responses following vaccination versus infection in a porcine circovirus-type 2 (PCV2) disease model show distinct differences in virus neutralization and epitope recognition. *Vaccine* 30, 4079-4085.
- Van Alstine, W.G., 2012. Respiratory System, In: *Diseases of swine*, 10th ed. Wiley-Blackwell, 348-362.
- Van Miert, 1996. Serum haptoglobin concentration in growing swine after intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* type D. *Can J Vet Res/Rev Can Rech Vet* 60, 222-227.
- Van Til, L.D., Dohoo, I.R., Morley, R.S., 1991. Epidemiological associations between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* antibody titers and lung lesions in Prince Edward Island swine herds. *Can J Vet Res* 55, 347-351.
- Vangroenweghe, F., Karriker, L., Main, R., Christianson, E., Marsteller, T., Hammen, K., Bates, J., Thomas, P., Ellingson, J., Harmon, K., Abate, S., Crawford, K., 2015a.

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. J Vet Diagnostic Investig 27, 606-610.

Vangroenweghe, F., Labarque, G.G., Piepers, S., Strutzberg-Minder, K., Maes, D., 2015b. *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in peri-weaned and post-weaned pigs in Belgium and The Netherlands: Prevalence and associations with climatic conditions. Vet J 205, 93-97.

Vangroenweghe, F., Willems, E., Maláček, J., Thas, O., Maes, D., 2018a. Use of tracheobronchial swab qPCR testing to confirm *Mycoplasma hyopneumoniae* seropositivity in an SPF breeding herd. Porc Heal Manag 4, 12.

Vangroenweghe, F., Willems, E., Thas, O., Maes, D., 2018b. Confirmation of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a breeding herd through tracheobronchial swab sampling and PCR. Vet Rec 183, 325.

Vicente, J., Segalés, J., Hofle, U., Balasch, M., Plana-Duran, J., Domingo, M., Gortazar, C., 2004. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). Vet Res 35, 243-253.

Vila, T., 2004. PCV2 and reproductive performance: facts and figures for the disbelievers. Veterinaria 48, 198-201.

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

- Villarreal, I., Vranckx, K., Calus, D., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Maes, D., 2012. Effect of challenge of pigs previously immunised with inactivated vaccines containing homologous and heterologous *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. BMC Vet Res 8, 2.
- Virginio, V.G., Gonchoroski, T., Paes, J.A., Schuck, D.C., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2014. Immune responses elicited by *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant antigens and DNA constructs with potential for use in vaccination against porcine enzootic pneumonia. Vaccine 32, 5832-5838.
- Vranckx, K., Maes, D., Calus, D., Villarreal, I., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2011. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. J Clin Microbiol 49, 2020-2023.
- Vranckx, K., Maes, D., Marchioro, S.B., Villarreal, I., Chiers, K., Pasmans, F., Haesebrouck, F., 2012. Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* strain. BMC Vet Res 8, 24.
- Warris, P.D., 1998. Choosing appropriate space allowance for slaughter pigs transported by road: a review. Vet Rec 142, 449-454.
- Warris, P.D., 2003. Optimal lairage times and conditions for slaughter pigs: a review. The Vet Rec 153, 170-176.
- Wilson, S., Van Brussel, L., Saunders, G., Taylor, L., Zimmermann, L., Heinritz, K., Ritzmann, M., Banholzer, E., Eddicks, M., 2012. Vaccination of piglets at 1 week of age with an

inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine reduces lung lesions and improves average daily gain in body weight. *Vaccine* 30, 7625-7629.

Woolley, L.K., Fell, S.A., Gonsalves, J.R., Raymond, B.B., Collins, D., Kuit, T.A., Walker, M.J., Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Jenkins, C., 2014. Evaluation of recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* P97/P102 paralogs formulated with selected adjuvants as vaccines against mycoplasmal pneumonia in pigs. *Vaccine* 32, 4333-4341.

Yagihashi, T., Kazama, S., Tajima, M., 1993. Seroepidemiology of mycoplasmal pneumonia of swine in Japan as surveyed by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* 34, 155-166.

Yang, J. S., Song, D. S., Kim, S. Y., Lyoo, K. S., Park, B. K., 2003. Detection of Porcine Circovirus Type 2 in Feces of Pigs with or without Enteric Disease by Polymerase Chain Reaction. *J Vet Diagn Invest* 15, 369-373.

Young, M.G., Cunningham, G.L., Sanford, S.E., Path, D., 2011. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *J Swine Health Prod* 19, 6.

Zhai, S.L., Chen, S.N., Xu, Z.H., Tang, M.H., Wang, F.G., Li, X.J., Sun, B.B., Deng, S.F., Hu, J., Lv, D.H., Wen, X.H., Yuan, J., Luo, M.L., Wei, W.K., 2014. Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control. *Virol J* 11, 88-100.

Zhang, J., Chai, J., Luo, Z., He, H., Chen, L., Liu, X., Zhou, Q., 2018. Meat and nutritional quality comparison of purebred and crossbred pigs. *Anim Sci J* 89, 202-10.



## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





La *hipótesis* que se plantea en esta Tesis Doctoral es que el estudio integral de la eficacia y la seguridad de las vacunas de circovirus porcino 2 y *Mycoplasma hyopneumoniae*, así como la correcta adaptación a Mhyo de las futuras reproductoras, tienen una influencia en los parámetros productivos y de bienestar del ganado porcino.

En base a la hipótesis planteada, los objetivos principales de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Analizar el efecto de los niveles de anticuerpos maternos frente a circovirus porcino 2 en la eficacia de la vacuna (medida por la ganancia media diaria, la viremia de circovirus porcino 2 y la mortalidad) en lechones vacunados a las tres semanas de edad con una vacuna comercial frente a este virus **(Capítulo 1)**.

2. Evaluar la eficacia de la exposición a *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante la tecnología de nebulización en condiciones de campo como estrategia de aclimatación de las futuras reproductoras **(Capítulo 2)**.

3. Comparar la reacción de fase aguda inducida por la aplicación de diferentes protocolos de vacunación contra el circovirus porcino 2 y *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante el estudio de dos proteínas de fase aguda en sangre (Haptoglobina y proteína C reactiva), los cambios en la temperatura rectal, la influencia del momento de la vacunación (el día del destete y el destete) y la raza (cruces comerciales y lechones ibéricos) **(Capítulo 3)**.



## **5. CAPÍTULOS**



# **Capítulo 1**

**Efecto de los anticuerpos de origen materno  
contra el circovirus porcino 2 (PCV-2) sobre el  
rendimiento y la viremia de PCV-2 en lechones  
vacunados en condiciones de campo**



### RESUMEN

Actualmente, la presentación más frecuente de PCV-2 es la infección subclínica en lechones tras el destete. El éxito de la vacunación contra PCV-2 se asocia al control de la enfermedad clínica, así como a la mejora de los parámetros de producción. Por consiguiente, el presente estudio tuvo por objetivo analizar el efecto de los niveles de AOM contra PCV-2 sobre la eficacia de la vacuna en lechones vacunados a las tres semanas de edad con una vacuna de subunidades comercial contra PCV-2. El estudio se realizó mediante el análisis de una base de datos con 6112 lechones, desde el destete hasta el sacrificio, de 4 regiones europeas diferentes.

Los resultados mostraron que el uso de la vacuna fue capaz de reducir la viremia de PCV-2, calculada como el área bajo la curva (ABC=  $60.29 \pm 3.73$ ), aumentar la ganancia de peso media diaria (GMD=  $0.65 \pm 0.01$  kg/día) y reducir mortalidad (7%) en lechones vacunados en comparación con los no vacunados (ABC de  $198.27 \pm 6.14$ ,  $0.62 \pm 0.01$  kg/día y 11%, respectivamente). La diferencia global respecto a la GMD entre ambos grupos fue de cerca de 30 g por día ( $p < 0.05$ ), incluso cuando se separaron por niveles altos y bajos de títulos de AOM. Asimismo, se observó que los animales con la GMD más alta pertenecían al grupo de lechones vacunados con títulos de anticuerpos altos o extremadamente altos (0.66 y 0.65 kg/día, respectivamente). Si atendemos únicamente a los animales con títulos de anticuerpos extremadamente altos, los resultados fueron similares en ambos grupos del estudio, sin embargo, se observó una diferencia numérica de 10 g/día a favor de los lechones vacunados. De igual forma, se observó una ausencia de correlación entre la GMD y los AOM, lo que sugiere que no hubo interferencia de los AOM con la vacuna estudiada, ya que se observó un crecimiento más rápido en los animales vacunados en comparación con los animales del grupo control (no vacunados), independientemente del nivel de AOM presente en el momento de la vacunación.

## Capítulo 1

---

Los resultados del presente estudio demostraron que los AOM contra PCV-2 transferidos a través de la ingesta de calostro confieren un efecto protector frente a esta infección viral. La vacuna utilizada en el presente estudio (Ingelvac CircoFLEX®) fue eficaz cuando se administró a las tres semanas de edad, y su eficacia no se vio afectada por el nivel de AOM en el momento de la vacunación.



### 1. INTRODUCCIÓN

El PCV-2 se ha asociado a varias afecciones clínicas en cerdos que pueden generar pérdidas económicas importantes en la industria porcina (Horlen et al., 2007; Kimöller et al., 2008). La manifestación clínica más frecuente de estas enfermedades es el síndrome multisistémico de adelgazamiento post-destete (PMWS), que se describió por primera vez en Canadá en 1991 (Clark et al., 1996; Harding et al., 1996). Se ha hecho uso del término de enfermedades por circovirus porcino (PCVD) para referirse al conjunto de afecciones relacionadas con el PCV-2 (Allan et al., 2002), y, posteriormente, se revisaron estos síndromes clínicos y se propusieron algunos nombres nuevos (Segalés, 2012). Actualmente, la presentación más frecuente de PCV-2 es la infección subclínica (IS-PCV-2) en lechones tras el destete. Otros síndromes que se han descrito son la enfermedad sistémica por PCV-2 (PCV-2-SD, anteriormente conocida como PMWS) (Harding et al., 1997; Rosell et al., 1999; Krakowka et al., 2004), la enfermedad pulmonar por PCV-2 (PCV-2-LD), la enfermedad entérica por PCV-2 (PCV-2-ED) (Harms et al., 2002; Kin et al., 2003, 2004; Opriessnig et al., 2007), la enfermedad reproductiva por PCV-2 (PCV-2-RD) (West et al., 1999; Brunborg et al., 2007; Madson et al., 2009) y el PDNS (Segalés, 2002). No obstante, la PCV-2-LD y la PCV-2-ED se han considerado insignificantes, puesto que generalmente el virus asociado a la inflamación intestinal y pulmonar se detecta en el marco de la PCV-2-SD (Tico et al., 2013; Baró et al., 2015).

El éxito de la vacunación contra PCV-2 se asocia al control de la enfermedad clínica, así como a la prevención de lesiones tisulares (Horlen et al., 2008; Kixmöller et al., 2008; Desrosiers et al., 2009; Segalés et al., 2009; Pejsak et al., 2010). Incluso cuando no se observan signos clínicos claros en casos de PCV-2-SI, varios estudios de campo han demostrado que la vacunación contra PCV-2 de los lechones puede mejorar los parámetros de producción [ganancia de peso media diaria (GMD)], porcentaje de

animales pequeños, estado físico y peso en canal (Young et al., 2011). En consecuencia, el uso de vacunas en granjas con PCVD clínica y PCV-2-SI ha provocado que la salud porcina general haya pasado de un periodo de brotes clínicos graves a nivel mundial (1997–2007) a infecciones subclínicas autolimitadas con brotes ocasionales. En este escenario de vacunación generalizada de lechones y de un uso cada vez mayor de vacunas contra el PCV-2 en cerdas, los niveles de AOM y su posible interferencia con las vacunas administradas a sus crías (Fort et al., 2009) pueden suponer un riesgo respecto a la eficacia de la vacunación. Por tanto, puede ser necesario ajustar los calendarios de vacunación comúnmente establecidos en torno al destete de los lechones.

Para la detección de anticuerpos contra PCV-2 en suero se pueden emplear distintas pruebas de laboratorio. Por tanto, se puede considerar la serología como una herramienta útil para monitorizar la presencia de anticuerpos en en la especie porcina, así como sus niveles en el momento de la vacunación. Tradicionalmente, se ha empleado el método IPMA (ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa) para la detección cuantitativa de anticuerpos contra PCV-2. Sin embargo, Guedes et al. (2002) demostraron que con el método IFAT (prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes) era posible obtener valores muy similares (concordancia del 98.6%) a los obtenidos con IPMA para el diagnóstico de enteropatía proliferativa porcina. Los niveles de anticuerpos contra PCV-2 en lechones se han descrito como moderados o altos cuando se detectan títulos de más de 1:320 o el 2.5  $\log_{10}$  equivalente, mediante el método IFAT (Hesse & Rowland, 2008).

El presente estudio tuvo por objetivo analizar el efecto de los niveles de AOM contra PCV-2 sobre la eficacia de la vacuna (medido por la GMD y la viremia de PCV-2) en lechones vacunados a las tres semanas de edad con una vacuna de subunidades comercial contra PCV-2. Este estudio se llevó a cabo en cuatro granjas diferentes de Europa.

### **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1. Descripción y situación de las granjas**

El presente estudio se llevó a cabo utilizando datos de cuatro ensayos de campo realizados en diferentes ubicaciones en Europa [norte y sur de Alemania (Fachinger et al., 2008; Kixmüller et al., 2008), Reino Unido (Von Richthofen et al., 2009) y Francia (Grosse Liesner et al., 2008)]. En este trabajo se utilizaron un total de 6112 lechones cruzados comerciales (1514 en el sur de Alemania y 1542 en el norte de Alemania; 1536 en el Reino Unido y 1520 en Francia) de cerdas no vacunadas contra PCV-2.

Estos cuatro estudios se realizaron hace 10 años, durante la fase epizootica de la enfermedad, por lo que la infección de las granjas tuvo lugar aproximadamente en el mismo momento. Se observaron signos clínicos, y el diagnóstico de enfermedad sistémica por PCV-2 se realizó conforme a los criterios aceptados. En tres estudios (Grosse Liesner et al., 2008; Kixmüller et al., 2008; Von Richthofen et al., 2009) se describió enfermedad sistémica por PCV-2 (PCV-2 SD) consistente, con el desmedro como un signo clínico importante. En el otro estudio (Fachinger et al., 2008), la mayoría de los signos clínicos fueron respiratorios, pero también se diagnosticó la enfermedad sistémica por PCV-2.

#### **2.2. Productos utilizados en el estudio**

Se administró una vacuna de subunidades inactivada (Ingelvac CircoFLEX®, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH) a las tres semanas de edad para la inmunización contra el PCV-2. La vacuna contenía la proteína de la cápside ORF2 de PCV-2 como componente activo y un polímero acuoso (carbómero) como adyuvante. Esta proteína se ha identificado como el principal antígeno inmunogénico de PCV-2 que induce una respuesta protectora (Nawagitgul et al., 2000; Blanchard et al., 2003). Posteriormente se insertó la secuencia del ORF2 en un sistema de expresión de baculovirus, empleando una

línea celular de insecto obtenida a partir de ovarios del cogollero del maíz *Sodoptera frugiperda* (células SF+) como huésped. El placebo, utilizado como control, consistió en un sobrenadante de un cultivo celular de insecto sin la proteína de la cápside de PCV-2, pero que contenía carbómero como adyuvante.

### **2.3. Diseño del estudio**

Los 4 ensayos de campo se realizaron en cumplimiento de los principios de la “Buena práctica clínica” y siguieron un diseño del estudio aleatorizado, con control negativo, doble ciego y con grupos paralelos. Todos los lechones incluidos en los estudios de campo recibieron una dosis única (1 ml) de la vacuna contra PCV-2 Ingelvac CircoFLEX® (vacuna) o de un sobrenadante de un cultivo celular de insecto con un polímero acuoso como adyuvante (placebo) mediante una inyección intramuscular en el cuello en torno al destete (de 2 a 3 semanas de edad). El destete y la transferencia a la transición tuvo lugar el día después de la vacunación (de 2 a 3 semanas de edad); los cerdos fueron transferidos a las unidades de engorde a las 9 semanas de edad. Todos los animales (vacunados o no) se mantuvieron en condiciones de estabulación convencional y se mezclaron en cuadras con el fin de asegurarse de que todos los cerdos del estudio estuvieran en condiciones de estabulación similares, recibieran el mismo alimento y estuvieran sujetos a las mismas prácticas de manejo. Con cada cambio de ubicación, se volvió a mezclar a los animales y se les asignó de forma aleatoria a las cuadras de acuerdo con el procedimiento habitual de la granja.

### **2.4. Recogida de muestras y parámetros del estudio**

Se recogieron muestras de sangre de todos los lechones el día de la inclusión, que coincidió con el momento del destete (de 2 a 3 semanas de edad), y antes de la inyección (vacuna o placebo) para determinar la presencia de anticuerpos contra el PCV-2 adquiridos a partir del calostro materno (título de PCV-2). Asimismo, se determinó el peso

de todos los animales individualmente en el momento de la inclusión y antes del sacrificio (alrededor de las 3 y 25 semanas de edad). Únicamente se utilizaron los datos procedentes de animales vivos con crotales auriculares al final del estudio para realizar análisis adicionales [5563 animales (91%); 2835 y 2728 del grupo vacunado y de control, respectivamente].

Para la cuantificación de la viremia de PCV-2, se recogieron muestras de sangre de un 15% de los animales del estudio previamente seleccionados de forma aleatoria, que fueron elegidos como muestra representativa (956 lechones en total; 484 del grupo vacunado y 472 del grupo de control), con una frecuencia semanal o quincenal durante todo el periodo del estudio.

### **2.5. Título de anticuerpos de origen materno (AOM) contra PCV-2**

La cuantificación del título de anticuerpos contra PCV-2 en muestras de suero porcino correspondientes a la primera recogida de muestras de sangre fue realizada por bioScreen GmbH (Múnich, Alemania), que empleó la prueba de IFAT. En resumen, se sembraron  $2-6 \times 10^4$  células sensibles a la infección por PCV-2 [células VIDO-R1 (Reddy et al., 1999; Liu et al., 2004)] en una placa de 96 pocillos con  $2-6 \times 10^4$  células/pocillo, y se inocularon con el virus de PCV-2 ( $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/pocillo) durante aproximadamente 48 h. Tras fijar las células con etanol, se añadieron por triplicado a las placas diluciones en serie de muestras de suero porcino, y se incubaron a 37 °C durante 1 hora, para permitir la unión de los anticuerpos si estos estaban presentes en el suero. Las placas se lavaron y se tiñeron a 37 °C durante una hora con un anticuerpo anti-porcino de cabra marcado con FITC (Dianova, Alemania, Núm. 114-095-003), que permitió la detección del antígeno en las células infectadas mediante microscopía de fluorescencia. Las muestras fueron leídas por un investigador independiente sin conocimiento de los grupos analizados. Las placas y los pocillos individuales se identificaron como positivos o negativos. Los títulos de

anticuerpos en suero se calcularon empleando el método de Reed y Muench, utilizando la dilución más alta que aún mostraba una reactividad específica por IFAT y el número de pocillos positivos por dilución. El método permitió detectar títulos de anticuerpos en un rango de 1:5 a 1:20480. Para el análisis de los títulos de AOM frente a PCV-2, los datos se transformaron a logaritmo en base 10 ( $\log_{10}$ ) (Fort et al., 2009). Tal como se ha indicado anteriormente, se utilizaron un total de 5563 animales (2835 y 2728 del grupo vacunado y de control, respectivamente).

Los animales se clasificaron en dos grupos diferentes en función de los resultados de los títulos de AOM (correspondientes a la obtención de las primeras muestras de 2 a 3 semanas de edad): “altos” ( $\geq 2.5 \log_{10}$ ) y “bajos” ( $< 2.5 \log_{10}$ ) en el momento de la vacunación. Además, se estableció un tercer grupo que incluía al 10% de los lechones con los títulos más altos de anticuerpos, cuyo límite se estableció por el percentil 90 ( $\geq 3.7 \log_{10}$ ).

### **2.6. Ganancia de peso media diaria (GMD)**

Se estableció la ganancia de peso como un parámetro principal de eficacia. Se calculó la ganancia de peso media diaria (kg/día) para cada animal como la diferencia entre el peso corporal correspondiente a dos momentos de determinación del peso, dividida por el número de días entre estos dos momentos de determinación del peso. Para cada uno de los cuatro ensayos analizados, se calculó la media de la GMD basándose en la GMD solo de los animales vivos al final del estudio por grupo de tratamiento. Del mismo modo, la media de la GMD se calculó utilizando todos los datos de un conjunto único. Tal como se ha indicado anteriormente, se utilizaron un total de 5563 animales (2835 y 2728 del grupo vacunado y de control, respectivamente).

### **2.7. Carga viral de PCV-2 en suero**

La cuantificación de la carga viral de PCV-2 en suero se llevó a cabo en bioScreen GmbH, (Münster, Alemania). Las muestras se analizaron por triplicado mediante un método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rt-PCR), tal como se ha descrito anteriormente (Brunborg et al., 2004). La cuantificación del ADN de PCV-2 se llevó a cabo mediante la comparación de la muestra desconocida con una curva estándar obtenida a partir de cantidades conocidas de ADN plasmídico del ORF de PCV-2 ( $10^4$ – $10^{12}$  copias/ml, pasos de dilución de 1:10) y se estableció un valor de  $10^4$  copias por mililitro de suero, basándose en experimentos de validación, como nivel de corte para una muestra positiva.

### **2.8. Análisis de los parámetros de la viremia de PCV-2**

Se calculó la carga viral media para cada lechón como la media aritmética de las cargas virales individuales [equivalentes genómicos/ml de suero] de cada día de muestreo. En este cálculo solo se incluyeron a los animales a los que fue posible hacer un seguimiento constante durante el transcurso del estudio. Estas muestras procedían de un 15% del total de los animales del estudio (956 lechones en total; 484 del grupo vacunado y 472 del grupo de control) que fueron previamente seleccionados de forma aleatoria.

Con el fin de comprender mejor la dinámica de la viremia en el presente estudio, se analizaron también los datos de PCV-2 por rt-PCR utilizando el ABC como un indicador de la carga viral a lo largo de este estudio. Se calculó el ABC utilizando el momento de muestreo y la carga viral de PCV-2 cuantificada por el método trapezoidal, como se ha descrito anteriormente (McKeown et al., 2005). Con el fin de analizar las diferencias entre los grupos del estudio, se calculó el valor medio del ABC para cada una de las poblaciones.

### **2.9. Mortalidad**

El personal de las granjas registró las muertes de animales que ocurrieron durante el estudio en cada una de ellas. Se registró el número de identificación, así como la fecha de la muerte o de la retirada del estudio de cada animal.

### **2.10. Análisis estadísticos**

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el Sistema SAS, V.9.1.3 (SAS institute Inc., Cary, NC, EE. UU.). Para todos los análisis se consideró al animal como la unidad experimental. El análisis incluyó a la granja como una variable. El nivel de significación se estableció en un p-valor < 0.05.

#### 2.10.1. Evaluación de la eficacia del protocolo de vacunación

Se realizó un análisis de homogeneidad basal antes del inicio del ensayo para verificar que los animales estaban distribuidos equitativamente entre los grupos de tratamiento en lo que se refiere al sexo y el peso. Se analizaron los parámetros de GMD, ABC y mortalidad para la presunción de la normalidad y la homogeneidad de las varianzas empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y de Levene, respectivamente. Las diferencias en la GMD, el ABC y la mortalidad entre los grupos se compararon empleando una prueba de ANOVA para las variables con distribución normal y la prueba de Kruskal-Wallis para las variables sin distribución normal.

#### 2.10.2. Efectos de los anticuerpos de origen materno sobre la GMD

Se realizó una regresión lineal para evaluar la potencia de la asociación entre el título de anticuerpos contra PCV-2 el día de la vacunación para los lechones vacunados y de control y la GMD durante todo el periodo de cría (desde las 4 hasta las 25 semanas de edad). Además, se realizó un análisis de regresión similar para los lechones vacunados,



pero separando a los animales en función de los títulos de PCV-2: bajos ( $< 2.5 \log_{10}$ ), altos ( $\geq 2.5 \log_{10}$ ) y extremadamente altos ( $\geq 3.7 \log_{10}$ ), tal como se ha descrito anteriormente.

### 2.10.3. Efectos de los anticuerpos de origen materno (AOM) sobre la viremia (ABC de PCV-2)

El análisis de las diferencias en el ABC entre los grupos (animales no vacunados frente a animales vacunados) se realizó separando a los animales en función de los títulos de PCV-2: bajos ( $< 2.5 \log_{10}$ ), altos ( $\geq 2.5 \log_{10}$ ) y extremadamente altos ( $\geq 3.7 \log_{10}$ ), tal como se ha descrito anteriormente.

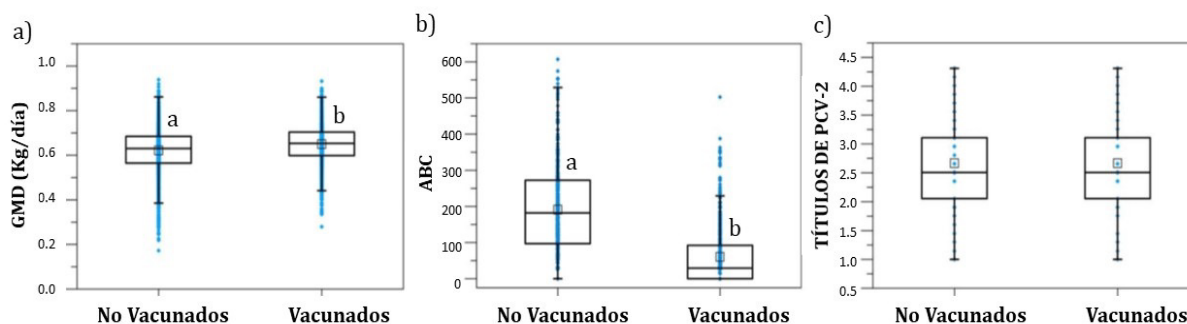
### 2.10.4. Efectos de la viremia (ABC) de PCV-2 sobre la GMD

Se realizó una regresión lineal para evaluar la potencia de la asociación entre el ABC de PCV-2 de los lechones vacunados y de control y la GMD durante todo el periodo de cría (desde las 4 hasta las 25 semanas de edad).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Análisis descriptivo del efecto de la vacunación**

El primer objetivo fue analizar el efecto de la vacuna sobre cada parámetro estudiado de forma independiente (Figura 1). La media de la GMD fue significativamente mayor en los animales vacunados ( $0.65 \pm 0.01$  kg/día) en comparación con los animales no vacunados ( $0.62 \pm 0.01$  kg/día), lo que corresponde a una diferencia global de la GMD entre los grupos de 30 g por día (Figura 1a;  $p < 0.05$ ).



**Figura 1.** Efecto de la vacunación sobre la GMD, la carga viral de PCV-2 (ABC) y el título de anticuerpos contra PCV-2. a) Comparación de la ganancia de peso media diaria (GMD, kg/día) entre los animales no vacunados (n = 2728) y los vacunados (n = 2835); b) comparación de la carga viral de PCV-2 como ABC entre los animales no vacunados (n = 484) y los animales vacunados (n = 472); c) comparación del título de anticuerpos contra PCV-2 (log10) entre los animales no vacunados (n = 2728) y los animales vacunados (n = 2835). Las diferentes letras (a, b) entre grupos experimentales indican diferencias significativas (p < 0.05).

**Tabla 1.** Media de la GMD (kg/día) ± EEM para cada uno de los cuatro estudios analizados.

Tratamiento	Sur de Alemania (Kixmöller et al., 2008)	Norte de Alemania (Fachinger et al., 2008)	Reino Unido (Von Richthofen et al., 2009)	Francia (Grosse Liesner et al., 2008)
Animales no vacunados (n = 2728)	0.61 ± 0.01 <sup>a</sup> (n = 654)	0.65 ± 0.01 <sup>a</sup> (n = 706)	0.56 ± 0.01 <sup>a</sup> (n = 657)	0.66 ± 0.01 <sup>a</sup> (n = 711)
Animales vacunados (n = 2835)	0.64 ± 0.01 <sup>b</sup> (n = 677)	0.67 ± 0.01 <sup>b</sup> (n = 718)	0.61 ± 0.01 <sup>b</sup> (n = 718)	0.68 ± 0.01 <sup>b</sup> (n = 722)
Diferencia de la GMD entre grupos (g/día)	30	20	50	20

n = número de animales. Las letras diferentes (<sup>a,b</sup>) entre grupos experimentales en una misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05). Únicamente se utilizaron los animales vivos al final del estudio por grupo de tratamiento.

Esta diferencia en el crecimiento de los animales se observó de igual modo en todas las granjas utilizadas en este estudio; en todas ellas, la GMD fue significativamente mayor

en los animales vacunados (Tabla 1;  $p < 0.05$ ), con un rango de diferencias de la GMD entre grupos de entre 20 y 50 g por día.

El valor medio del ABC en los animales vacunados ( $60.29 \pm 3.73$ ) fue significativamente ( $p < 0.05$ ) menor que el de los animales no vacunados ( $198.27 \pm 6.14$ ). En la Figura 1b se representa el perfil de la carga viral de PCV-2 como ABC al final del estudio. El ABC global en los animales vacunados fue 3.3 veces menor que la de los animales no vacunados ( $p < 0.05$ ).

Se determinaron los títulos de AOM de todos los animales el día de la vacunación. Antes de la vacunación, los títulos de anticuerpos contra PCV-2 de ambos grupos de tratamiento fueron estadísticamente iguales, con un valor medio geométrico de  $2.7 \log_{10}$  (Figura 1c;  $p > 0.05$ ). Se observó el mismo resultado en todas las granjas utilizadas en este estudio, donde los AOM fueron significativamente similares en los animales vacunados frente a los animales no vacunados (Tabla 2;  $p > 0.05$ ).

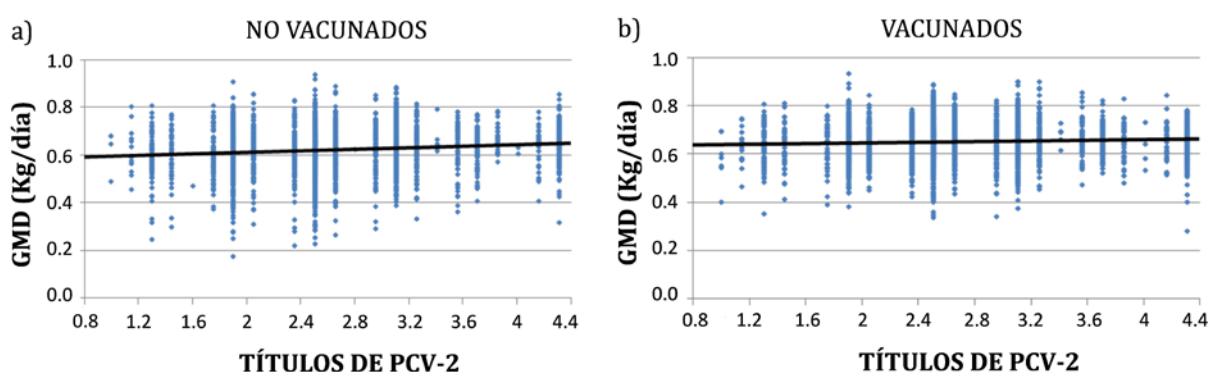
**Tabla 2.** Media de AOM [título de anticuerpos contra PCV-2 ( $\log_{10}$ )]  $\pm$  EEM para cada uno de los cuatro estudios analizados.

Tratamiento	Sur de Alemania (Kixmöller et al., 2008)	Norte de Alemania (Fachinger et al., 2008)	Reino Unido (Von Richthofen et al., 2009)	Francia (Grosse Liesner et al., 2008)
Animales no vacunados (n = 2728)	$2.80 \pm 0.03$ (n = 654)	$2.87 \pm 0.03$ (n = 706)	$2.42 \pm 0.02$ (n = 657)	$2.56 \pm 0.02$ (n = 711)
Animales vacunados (n = 2835)	$2.83 \pm 0.03$ (n = 677)	$2.86 \pm 0.03$ (n = 718)	$2.39 \pm 0.02$ (n = 718)	$2.60 \pm 0.02$ (n = 722)

n = número de animales. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Únicamente se utilizaron los animales vivos al final del estudio por grupo de tratamiento.

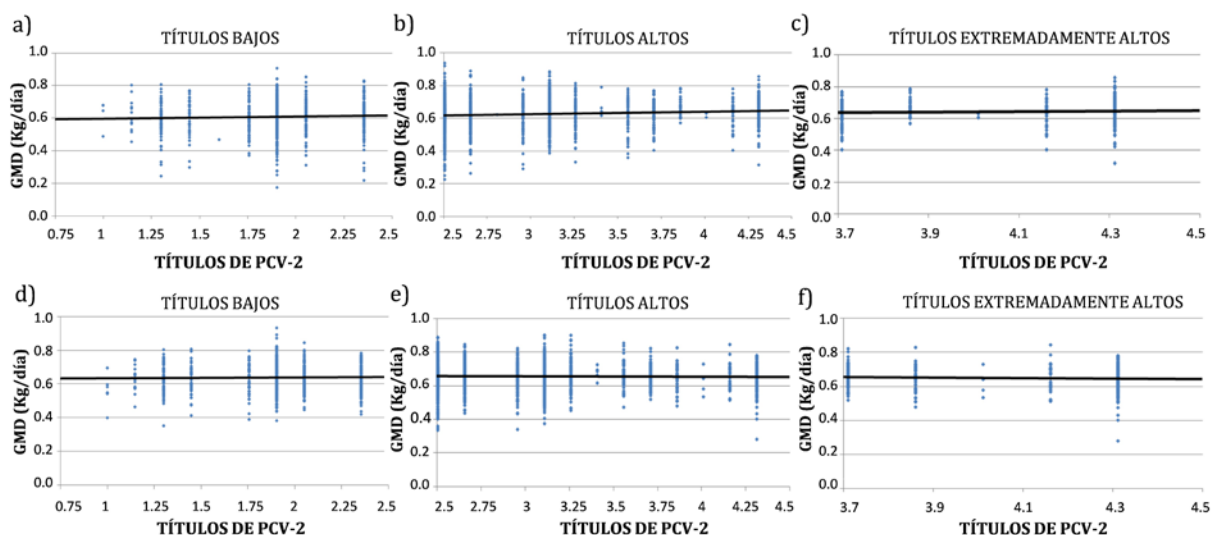
### 3.2. Ganancia de peso media diaria (GMD) en función de la presencia de anticuerpos de origen materno (AOM)

Se realizó el análisis con el fin de investigar si la presencia de AOM contra PCV-2 influía de algún modo en la eficacia de la vacunación en lo que se refiere a la GMD. En la Figura 2 se presenta la GMD según los títulos de AOM en animales vacunados y no vacunados. No se observó una correlación significativa ( $p > 0.05$ ) entre estas dos variables en ambos grupos de tratamiento.



**Figura 2.** Ajuste bivariante entre la ganancia de peso media diaria (GMD, kg/día) y el título de anticuerpos contra PCV-2 ( $\log_{10}$ ). Los gráficos muestran los datos correspondientes a los animales no vacunados ( $n = 2728$ ) a) y a los animales vacunados ( $n = 2835$ ) b). Se calculó la GMD de cada animal como la diferencia del peso corporal entre dos periodos de determinación del peso (a las 4 y 25 semanas de edad) dividida por el número de días entre estos.

Se utilizaron los niveles de AOM registrados para todos los animales el día de la inclusión (a las 3 semanas de edad) para evaluar la distribución de los niveles de anticuerpos en la población del estudio. Se separaron los animales en función de los títulos de PCV-2 en el momento de la vacunación: bajos ( $< 2.5 \log_{10}$ ), altos ( $\geq 2.5 \log_{10}$ ) y extremadamente altos ( $\geq 3.7 \log_{10}$ ). La Figura 3 muestra una ausencia de correlación entre la GMD y los AOM de los animales vacunados o no vacunados de acuerdo con esta agrupación ( $p > 0.05$ ).



**Figura 3.** Ajuste bivariable entre la GMD y el título de AOM contra PCV-2 dividido según los títulos de PCV-2. Los gráficos muestran los datos correspondientes a los animales no vacunados ( $n = 2728$ ) y a los animales vacunados ( $n = 2835$ ). Análisis dividido según los títulos de PCV-2: a) títulos bajos no vacunados ( $< 2.5 \log_{10}$ ;  $n = 811$ ); b) títulos altos no vacunados ( $\geq 2.5 \log_{10}$ ;  $n = 1917$ ); c) títulos extremadamente altos no vacunados ( $\geq 3.7 \log_{10}$ ;  $n = 300$ ); d) títulos bajos vacunados ( $< 2.5 \log_{10}$ ;  $n = 877$ ), e) títulos altos vacunados ( $\geq 2.5 \log_{10}$ ;  $n = 1958$ ) y f) títulos extremadamente altos vacunados ( $\geq 3.7 \log_{10}$ ;  $n = 334$ ).

Cuando se analizó la GMD comparando animales vacunados y no vacunados, con títulos de anticuerpos contra el PCV-2 bajos ( $< 2.5 \log_{10}$ ) y altos ( $\geq 2.5 \log_{10}$ ) en el momento de la vacunación (Tabla 3), la GMD fue significativamente mayor en los animales vacunados frente a los animales control (no vacunados) en ambos grupos (títulos de anticuerpos bajos: 0.64 kg/día vs. 0.61 kg/día, respectivamente; títulos de anticuerpos altos: 0.66 kg/día vs. 0.62 kg/día, respectivamente;  $p < 0.05$ ). En cambio, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos experimentales (vacunados frente a no vacunados) tras un análisis de la población de animales con títulos extremadamente altos de anticuerpos contra PCV-2 ( $\geq 3.7 \log_{10}$ ). Sin embargo, se observó una diferencia numérica (10 g) a favor de los animales vacunados (0.65 kg/día frente a 0.64 kg/día, respectivamente), y se debe tener en cuenta el reducido número de animales en este grupo, lo que disminuye significativamente la potencia estadística. Es importante señalar

## Capítulo 1

que, en ambos grupos del estudio, los niveles más bajos de la GMD se observaron en el grupo con títulos bajos de anticuerpos contra PCV-2.

**Tabla 3.** Media de la GMD (kg/día) para los animales no vacunados y los animales vacunados según los niveles de anticuerpos contra PCV-2.

<b>Títulos de PCV-2</b>	<b>Animales no vacunados (n = 2728)</b>	<b>Animales vacunados (n = 2835)</b>
Títulos bajos ( $< 2.5 \log_{10}$ )	0.61 <sup>a,A</sup> (n = 811)	0.64 <sup>a,B</sup> (n = 877)
Títulos altos ( $\geq 2.5 \log_{10}$ )	0.62 <sup>b,A</sup> (n = 1.617)	0.66 <sup>b,B</sup> (n = 1.624)
Títulos extremadamente altos ( $\geq 3.7 \log_{10}$ )	0.64 <sup>c,A</sup> (n = 300)	0.65 <sup>b,A</sup> (n = 334)

Letras diferentes <sup>(a,b,c)</sup> en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las letras diferentes <sup>(A,B)</sup> en una misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Únicamente se utilizaron los animales vivos al final del estudio por grupo de tratamiento.

Tras el análisis de la GMD según los diferentes niveles de títulos de anticuerpos contra PCV-2 (bajos, altos y extremadamente altos) en cada uno de los grupos del estudio (animales no vacunados frente a animales vacunados), se observa que, en el caso de los animales no vacunados, existen diferencias estadísticas entre todos los niveles (0.61 kg/día, 0.62 kg/día y 0.64 kg/día), mientras que en los animales vacunados solo se observan diferencias estadísticas entre el nivel bajo y los demás niveles, no existiendo diferencias entre el nivel alto y extremadamente alto (0.66 kg/día frente a 0.65 kg/día).

Debido a estos resultados, se realizaron dos análisis adicionales para evaluar de forma pormenorizada el grupo con títulos extremadamente altos de anticuerpos. Para el primer análisis, se realizó una comparación de aquellos animales con títulos de anticuerpos contra PCV-2  $\geq 4.31 \log_{10}$  (títulos de anticuerpos más altos) de ambos grupos

del estudio (no vacunados  $n = 158$  y animales vacunados  $n = 163$ ), sin que se hallara ninguna diferencia significativa entre estos ( $p > 0.05$ ). Para el segundo análisis, se compararon los animales con los títulos de anticuerpos más altos ( $\geq 4.31 \log_{10}$ ;  $n = 163$ ) con los animales con los títulos de anticuerpos más bajos ( $\leq 1.90 \log_{10}$ ;  $n = 202$ ) solo en el grupo de animales vacunados, y se observaron diferencias numéricas superiores (10 g;  $p > 0.05$ ) en el grupo con los títulos de anticuerpos más altos.

### **3.3. Nivel de viremia (ABC) de PCV-2 según los anticuerpos de origen materno (AOM)**

Al analizar el ABC correspondiente a los diferentes niveles de títulos de anticuerpos contra PCV-2 (bajos, altos y extremadamente altos) en cada uno de los grupos del estudio (animales no vacunados frente a animales vacunados; Tabla 4), se observa que, en el caso de los animales no vacunados, solo existen diferencias estadísticas entre el nivel bajo y extremadamente alto (225.0 vs. 147.6, respectivamente), mientras que en los animales vacunados no se observaron diferencias entre los distintos niveles (títulos bajos: 63.4, títulos altos: 55.4 y títulos extremadamente altos: 75.5). Tras comparar los grupos del estudio respecto a cada uno de los niveles de anticuerpos, se observa que, en todos los casos, la viremia es estadísticamente superior en los animales no vacunados en comparación con los animales vacunados (títulos bajos: 225.0 vs. 63.4; títulos altos: 188.5 vs. 55.4 y títulos extremadamente altos: 147.6 vs. 75.5, respectivamente;  $p < 0.05$ ).

# Capítulo 1

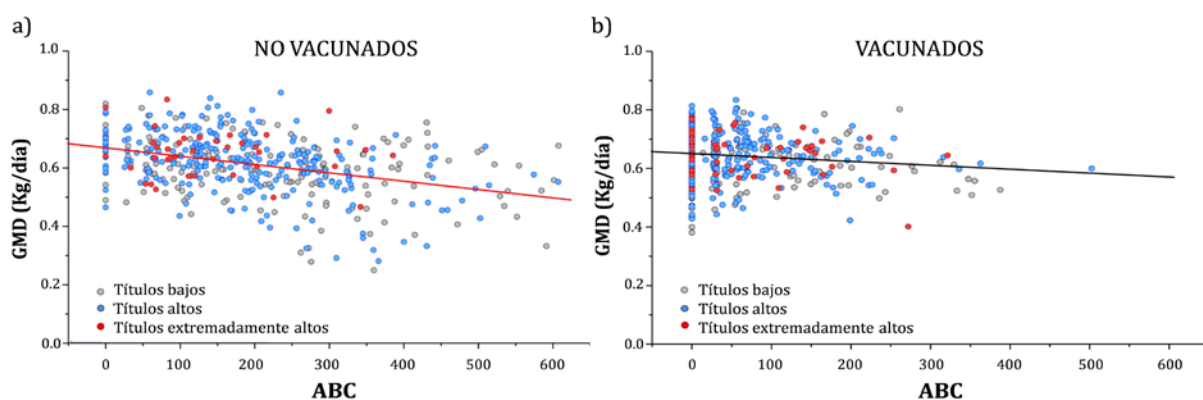
**Tabla 4.** Media del ABC de la carga de PCV-2 a lo largo del tiempo para los animales no vacunados y los animales vacunados, según los niveles de anticuerpos contra PCV-2.

Títulos de PCV-2	Animales no vacunados (n = 2728)	Animales vacunados (n = 2835)
Títulos bajos (< 2.5 log <sub>10</sub> )	225.0 <sup>a,A</sup> (n = 169)	63.4 <sup>a,B</sup> (n = 173)
Títulos altos (≥ 2.5 log <sub>10</sub> )	188.5 <sup>ab,A</sup> (n = 265)	55.4 <sup>a,B</sup> (n = 262)
Títulos extremadamente altos (≥ 3.7 log <sub>10</sub> )	147.6 <sup>b,A</sup> (n = 38)	75.5 <sup>a,B</sup> (n = 49)

Las letras diferentes <sup>(a,b)</sup> en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Las letras diferentes <sup>(A,B)</sup> en una misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Solo se utilizó un 15% de animales del estudio (muestra representativa) previamente seleccionados de forma aleatoria.

### 3.4. Ganancia de peso media diaria (GMD) según el nivel de viremia (ABC) de PCV-2

Se observó una correlación negativa ( $R = -0.3748$ ) significativa ( $p < 0.05$ ) entre la GMD y el ABC (Figura 4) en los cerdos no vacunados. Por lo tanto, cuanto mayor es el ABC de la viremia de PCV-2, más baja es la GMD. No se observó esta correlación en la población de animales vacunados ( $p = 0.06$ ).



**Figura 4.** Ajuste bivariable entre la GMD y la viremia (ABC). El gráfico (a) muestra los datos correspondientes a los animales no vacunados (n = 472) y el gráfico (b) a los animales vacunados (n = 484).



### 3.5. Mortalidad

La mortalidad en los animales vacunados fue siempre más baja que en los animales control, pudiéndose observar diferencias estadísticamente significativas en dos de los estudios ( $p < 0.05$ ) (Tabla 5). Además, en la combinación de los datos procedentes de los cuatro estudios, la mortalidad en los animales vacunados fue significativamente menor que en los cerdos no vacunados (7% frente a 11%, respectivamente;  $p < 0.05$ ) (Tabla 5). Sin embargo, no se observó una relación significativa entre los AOM contra PCV-2 y la mortalidad entre las granjas.

**Tabla 5.** Porcentaje de la mortalidad correspondiente a cada uno de los cuatro estudios analizados y a los datos combinados.

Tratamiento	Sur de Alemania (Kixmöller et al., 2008)	Norte de Alemania (Fachinger et al., 2008)	Reino Unido (Von Richthofen et al., 2009)	Francia (Grosse Liesner et al., 2008)	Datos combinados
Animales no vacunados (%)	14 <sup>a</sup>	9	15 <sup>a</sup>	6	11 <sup>a</sup>
Animales vacunados (%)	10 <sup>b</sup>	7	5 <sup>b</sup>	5	7 <sup>b</sup>

Las letras diferentes <sup>(a,b)</sup> en una misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los datos combinados hacen referencia a la agrupación de los animales de todas las granjas estudiadas.

## 4. DISCUSIÓN

A principios de los años 90, apareció la PCV-2-SD como una nueva enfermedad porcina que se caracterizaba por un desmedro, una reducción importante de la GMD y una alta tasa de mortalidad, entre las 5 y 12 semanas de edad principalmente (Harding & Clark, 1997; Allan & Ellis, 2000). Además, la enfermedad provocó un incremento de los costes de producción, no solo debido a la mortalidad y la pérdida de GMD, sino también a un incremento de los costes de medicamentos y al número de animales sin valor comercial

(Alarcon et al., 2013). Por consiguiente, se observó una pérdida de rentabilidad en las granjas afectadas. Sin embargo, la aparición de vacunas contra PCV-2 a finales de la década de los 2000 demostró que es posible hacer frente a la enfermedad, así como la prevención de infecciones subclínicas deriva en beneficios adicionales (Segalés, 2015).

Los AOM están presentes en todos los lechones siempre que se produzca una ingesta adecuada de calostro (Rooke & Bland, 2002); los niveles de dichos anticuerpos en suero disminuyen progresivamente durante las fases de lactancia y transición (Rodríguez-Arrijo et al., 2002). Normalmente, la viremia de PCV-2 aparece entre la fase final de transición y el comienzo de la fase de engorde, que coincide con el momento en el que los AOM alcanzan los niveles mínimos (Sibila et al., 2004; McIntosh et al., 2006), lo que sugiere que los AOM confieren un cierto grado de protección frente al desarrollo de la enfermedad.

Ya desde el principio, la vacunación de lechones demostró ser altamente eficaz para el control de la PCV-2-SD y de la PCV-2-SI (Fachinger et al., 2008). No obstante, teniendo en cuenta que la vacunación tiene lugar con la presencia de inmunidad transferida por la madre, se debe considerar la posible interferencia de los AOM en la eficacia de la vacuna. La interferencia con los AOM podría depender de la vacuna, ya que las diferentes vacunas disponibles en el mercado se basan en diferentes sistemas de expresión de antígenos y difieren también en cantidad de antígeno, pureza y adyuvantes. Como hipótesis de trabajo, se esperaba que la vacuna empleada en el presente estudio fuera menos eficaz en animales con títulos “altos” de AOM. Sin embargo, se demostró la eficacia de la vacuna independientemente del nivel de AOM presente en el momento de la vacunación. Por consiguiente, la vacuna utilizada fue capaz de superar los niveles habituales de AOM, reducir las cargas de viremia y aumentar la GMD en comparación con los lechones no vacunados (Fachinger et al., 2008; Horlen et al., 2008), con una diferencia global respecto

a la GMD entre los grupos de 30 g por día, tanto para niveles bajos como altos de AOM. Además, de acuerdo con los resultados obtenidos, no se observó una interferencia de los AOM en la eficacia de la vacuna probada, ya que se observó un crecimiento más rápido en los animales vacunados en comparación con los animales del grupo control no vacunados, independientemente del nivel de AOM presente en el momento de la vacunación.

Asimismo, el uso de la vacuna redujo la mortalidad en los animales vacunados. No obstante, no se observó una asociación significativa entre los AOM contra PCV-2 y la mortalidad entre las granjas, probablemente porque la mortalidad se debía a varios factores (de tipo infeccioso y no infeccioso), siendo la inmunidad materna frente a PCV-2 uno de ellos.

La interferencia de la inmunidad transferida por la madre con cualquier vacuna se puede describir como un bloqueo del antígeno por los anticuerpos circulantes o por otros componentes, posiblemente mediados por células, adquiridos a través del calostro. Este es un fenómeno bien conocido en otras enfermedades infecciosas porcinas, como el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) (Pomorska-Mól et al., 2010), el virus de la fiebre porcina clásica (Suradhat et al., 2009), el virus de la gripe A (VGA) (Kitikoon et al., 2006) o el parvovirus porcino (Gava et al., 2017). Por ejemplo, los cerdos con títulos significativos de AOM específicos contra el VGA pueden presentar una supresión de las respuestas adaptativas de anticuerpos a una infección homóloga o la vacunación (Renshaw et al., 1975; Kitikoon et al., 2006). Tanto para el VGA como para el VEA, los datos indican que la respuesta inmune celular parece ser menos sensible a los AOM (Vincent et al., 2012). Se ha estudiado anteriormente el impacto de los AOM sobre la inmunización activa con vacunas contra PCV-2 en cerdos jóvenes (Haake et al., 2014; Feng et al., 2016; Martelli et al., 2016). En uno de estos estudios se observó que, en las condiciones de ese ensayo, fue la edad de la vacunación, en lugar de los AOM, lo que tuvo influencia sobre la eficacia en

el control de la PCVD (Haake et al., 2014). Los autores concluyeron que la vacunación contra PCV-2 en presencia de niveles altos de AOM resulta eficaz cuando se administra a las 3 semanas de edad, pero no en cerdos de 1 semana de edad, lo que sugiere que la eficacia de la vacuna fue dependiente del nivel de AOM. Estos mismos autores especularon que otros factores relacionados con la edad podrían haber interferido en la eficacia de la vacuna en lechones de 1 semana de edad (Haake et al., 2014). En otro estudio en el que se utilizó una vacuna diferente contra PCV-2, aunque no se pudo descartar una interferencia en el caso de los títulos más altos de AOM, los autores concluyeron que, en condiciones de campo, este efecto es probablemente insignificante (Feng et al., 2016). El efecto de interferencia de los AOM podría generar una falta de inmunidad pasiva, pero también una falta de inmunización activa, dando lugar a un peor rendimiento del crecimiento de los animales con la exposición. En un estudio en cerdas con títulos altos inducidos por la vacunación, se concluyó que se debe tener en cuenta un cierto grado de interferencia de los AOM en la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz (Martelli et al., 2016). Los autores concluyeron que una estrategia de vacunación óptima contra PCV-2 debe lograr un equilibrio entre los niveles de inmunidad pasiva, las prácticas de manejo y el momento de la infección. Al contrario de esta afirmación, este estudio muestra que los cerdos que presentaron una mayor GMD fueron aquellos con títulos altos o extremadamente altos de AOM en el momento de la vacunación (bajos: 0.64; altos: 0.66 y extremadamente altos: 0.65 kg/día). Esta observación difiere ligeramente de los resultados obtenidos por Feng et al. (2016), en los que se observó el mismo crecimiento en los lechones vacunados con títulos bajos y altos de AOM (n = 78 y 93 animales, respectivamente). Esta diferencia podría explicarse por el tamaño de los grupos en ambos estudios. No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio podrían deberse al hecho de que un título alto de anticuerpos significa un nivel de protección alto en la exposición al virus de campo

(McKeown et al., 2005). Estos animales contaban con una protección doble aparente, la proporcionada por sus propios títulos altos de AOM (inmunidad pasiva) y la conferida por la vacunación (inmunidad activa que supera en su mayoría a los AOM). Es muy probable que, en estas circunstancias, los niveles de anticuerpos permanezcan bastante altos durante toda la vida del animal y, por lo tanto, que el animal esté protegido frente a la exposición natural.

En los lechones con una cantidad extremadamente alta de anticuerpos en el momento de la vacunación ( $\geq 4.31 \log_{10}$ ) el crecimiento observado fue igual o incluso numéricamente mejor (10 g;  $p > 0.05$ ) que el de los animales con la cantidad más baja de anticuerpos circulantes ( $\leq 1.90 \log_{10}$ ). Este hecho sugiere que los AOM no neutralizaron el antígeno de la vacuna, incluso en el caso de las concentraciones más altas de anticuerpos, lo que reduce la probabilidad de una presunta interferencia. Esta observación coincide con los resultados obtenidos en el estudio de Feng et al. (2016), en el que se compararon 10 animales con títulos extremadamente altos de AOM con 157 animales con títulos más bajos de AOM sin que fuera posible observar diferencias estadísticas en el crecimiento.

Por otro lado, el presente estudio también muestra que, en la población no vacunada, los cerdos con un mayor crecimiento fueron aquellos que presentaron títulos altos o muy altos de AOM (bajos: 0.61 kg/día; altos: 0.63 kg/día y extremadamente altos: 0.64 kg/día), lo que respalda el hecho de que la inmunidad maternal puede conferir un cierto grado de protección. En el estudio de Feng et al. se obtuvieron resultados similares (Feng et al., 2016). En el caso de los grupos con títulos extremadamente altos y con los títulos más altos de AOM ( $\geq 3.7$  y  $\geq 4.31 \log_{10}$ , respectivamente), no se observaron diferencias estadísticas respecto a la GMD entre los animales vacunados y los no vacunados. Se debe

tener en cuenta la baja potencia estadística en estos grupos seleccionados para los títulos extremadamente altos de AOM.

Estas observaciones reafirman el hecho de que la transferencia de AOM a través de la ingesta de calostro tiene un efecto protector frente a la infección por PCV-2. En estudios anteriores en los que se utilizó la misma vacuna que en el presente ensayo se obtuvieron resultados similares (López-Soria et al., 2014; Feng et al., 2016). Aunque no se pudo demostrar estadísticamente el efecto de la vacuna en relación con la GMD en esta subpoblación de cerdos que recibieron títulos extremadamente altos de AOM, también es cierto que no fue posible hallar pruebas irrefutables de interferencia. En el caso de los animales no vacunados con títulos muy altos y con los títulos extremadamente altos de AOM, parecen estar más protegidos frente al PCV-2 que los animales con títulos bajos y, por tanto, se observó un buen rendimiento del crecimiento en ellos. Los resultados obtenidos se podrían explicar por una mejor protección temprana en estos animales (Sibila et al., 2004) debido a la presencia de un tipo de factor inmunitario del calostro, además de anticuerpos como linfocitos y citocinas (Rooke et al., 2002), que podrían contribuir a una mejor inmunidad basal. Por otro lado, podría confundirse el efecto con el amplio beneficio que la ingesta de una gran cantidad de calostro confiere a los lechones durante toda su vida (Declerk et al., 2016). Es posible que esta pequeña subpoblación de lechones que reciben títulos extremadamente altos de AOM no necesite una inmunización activa contra PCV-2 en el contexto de una granja bien protegida.

Sin embargo, desde un planteamiento práctico de vacunación en el que no es posible determinar el estado de AOM de cada cerdo y no podemos asumir la existencia de inmunidad, se debe vacunar a toda la población de lechones para asegurar una protección homogénea y plena. Asimismo, estos resultados podrían respaldar la vacunación de las cerdas, puesto que la generación de títulos altos de AOM (Lopez-Rodriguez et al., 2016)

protegería a los lechones de una infección temprana y no interferiría con la inmunización activa contra PCV-2. Los datos actuales respaldan la idea de que la vacunación contra PCV-2 da lugar a una reducción significativa de la viremia de los lechones, independientemente del estado de AOM inicial, lo que confirma el efecto positivo de la vacunación. Se observó además una mayor ABC de la carga viral y una GMD menor en los animales no vacunados en comparación con los vacunados, lo que concuerda con los resultados obtenidos en un estudio similar (López-Soria et al., 2014). Los resultados del presente estudio demostraron que la eficacia (en términos de mejora de la GMD y de la viremia) de la vacuna utilizada en este estudio (Ingelvac CircoFLEX®), cuando se administró a las 3 semanas de edad para controlar el PCV-2, no se vio afectada por el nivel de AOM en el momento de la vacunación.

### 5. REFERENCIAS

- Alarcon, P., Rushton, J., Wieland, B., 2013. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England—an economic disease model. *Prev vet med* 110, 88–102.
- Allan, G., Krakowka, S., Ellis, J., 2002. PCV2: ticking time bomb. *Pig Progress* 18, 14–5.
- Allan, G.M., Ellis, J.A. 2000. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3–14.
- Baró, J., Segalés, J., Martínez, J., 2015. Porcine circovirus type 2 (PCV2) enteric disease: an independent condition or part of the systemic disease? *Vet Microbiol* 176, 83–87.
- Blanchard, P., Mahe, D., Cariolet, R., Keranflec’h, A., Baudouard, M., Cordioli, P., Albina, E., Jestin, A., 2003. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. *Vaccine* 21, 4565–75.
- Brunborg, I.M., Jonassen, C.M., Moldal, T., Bratberg, B., Lium, B., Koenen, F., Schönheit, J., 2007. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *J Vet Diagn Invest* 19, 368–75.
- Brunborg, I.M., Moldal, T., Jonassen, C.M., 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 122, 171–78.
- Clark E., 1996. Pathology of the post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs. *Proceedings of the WCASP*, 22-25.



- Declerck, I., Dewulf, J., Sarrazin, S., Maes, D., 2016. Long-term effects of colostrum intake in piglet mortality and performance. *J Anim Sci* 94, 1633–43.
- Desrosiers, R., Clark, E., Tremblay, D., Tremblay, R., Polson, D., 2009. Use of a one-dose subunit vaccine to prevent losses associated with porcine circovirus type 2. *J Swine Health Prod* 17, 148–54.
- Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S.B., Saalmüller, A., Elbers, K., 2008. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* 26, 1488–99.
- Feng, H., Segalés, J., Fraile, L., López-Soria, S., Sibila, M., 2016. Effect of high and low levels of maternally derived antibodies on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection dynamics and production parameters in PCV2 vaccinated pigs under field conditions. *Vaccine* 34, 3044–50.
- Fort, M., Sibila, M., Pérez-Martín, E., Nofrarías, M., Mateu, E., Segalés, J., 2009. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine* 27, 4031–7.
- Gava, D., Souza, C.K., Mores, T.J., Argenti, L.E., Streck, A.F., Canal, C.W., Bortolozzo, F.P., Wentz, I., 2017. Dynamics of vanishing of maternally derived antibodies of ungulate protoparvovirus 1 suggests an optimal age for gilts vaccination. *Trop Anim Health Prod* 49, 1085–8.
- Grosse Liesner, B., Orveillon, F., Fachinger, V., Denotte, J., 2008. Efficacy of Ingelvac CircoFLEX® in face of maternal antibodies in a field trial in France. *Allen D. Leman Swine Conference —Recent Research Reports*.

- Guedes, R.M., Gebhart, C.J., Winkelman, N.L., Mackie-Nuss, R.A., 2002. A comparative study of an indirect fluorescent antibody test and an immunoperoxidase monolayer assay for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *J Vet Diagn Invest* 14, 420–3.
- Haake, M., Palzer, A., Rist, B., Weissenbacher-Lang, C., Fachinger, V., Eggen, A., Ritzmann, M., Eddicks, M., 2014. Influence of age on the effectiveness of PCV2 vaccination in piglets with high levels of maternally derived antibodies. *Vet Microbiol* 168, 272–280.
- Harding, J., 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. *Proceedings of the WCASP*, 21.
- Harding, J.C., Clark, E.G., 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Swine Health Prod* 5, 201–3.
- Harms, P.A., Halbur, P.G., Sorden, S.D., 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Swine Health Prod* 10, 27–30.
- Hesse, D., Rowland, B., 2008. Circovirus vaccination decisions: Herd profiling and next generation diagnostic testing. *Proceedings of the Allen DL Swine Conf*, 68–71.
- Horlen, K.P., Dritz, S.S., Nietfeld, J.C., Henry, S.C., Hesse, R.A., Oberst, R., Hays, M., Anderson J., Rowland R.R., 2008. A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *J Am Vet Med Assoc* 232, 906–12.
- Horlen, K.P., Schneider, P., Anderson, J., Nietfeld, J.C., Henry, S.C., Tokach, L.M., Rowland, R.R., 2007. A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: clinical features and association with the PCV2b genotype. *J Swine Health Prod* 15, 270–278.

- Kim, J., Chung, H-K., Chae, C., 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J* 166, 251–6.
- Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Chae, C., 2004. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Can J Vet Res* 68, 218–21.
- Kitikoon, P., Nilubol, D., Erickson, B.J., Janke, B.H., Hoover, T.C., Sornsen, S.A., Thacker, E.L., 2006. The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 112, 117–28.
- Kixmüller, M., Ritzmann, M., Eddicks, M., Saalmüller, A., Elbers, K., Fachinger, V., 2008. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine* 26, 3443–51.
- Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Meehan, B., Oglesbee, M., Alldinger, S., Allan, G., 2004. Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristic of porcine circovirus-2-associated postweaning multisystemic wasting disease. *Vet Pathol* 41, 471–81.
- Liu, Q., Tikoo, SK., Willson, P., Babiuk, LA., 2004. Google Patents: Methods to culture circovirus.
- Lopez-Rodriguez, A., Dewulf, J., Meyns, T., Del-Pozo-Sacristán, R., Andreoni, C., Goubier, A., Chapat, L., Charreyre, C., Joisel, F., Maes, D., 2016. Effect of sow vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) on virological profiles in herds with or without PCV2 systemic disease. *Can Vet J* 57, 619–28.
- López-Soria, S., Sibila, M., Nofrarías, M., Calsamiglia, M., Manzanilla, E., Ramirez-Mendoza, H., Mínguez A., Serrano, J.M., Marín, O., Joisel, F., Charreyre, C., Segalés, J., 2014. Effect

of porcine circovirus type 2 (PCV2) load in serum on average daily weight gain during the postweaning period. *Vet Microbiol* 174, 296–301.

Madson, D.M., Ramamoorthy, S., Kuster, C., Pal, N., Meng, X-J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2009. Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. *Vet Res* 40, 10.

Martelli, P., Saleri, R., Ferrarini, G., De Angelis, E., Cavalli, V., Benetti, M., Ferrari, L., Canelli, E., Bonilauri, P., Arioli, E., Caleffi, A., Nathues, H., Borghetti, P., 2016. Impact of maternally derived immunity on piglets' immune response and protection against porcine circovirus type 2 (PCV2) after vaccination against PCV2 at different age. *BMC Vet Res* 12, 77.

McIntosh, K.A., Harding, J.C., Ellis, J.A., Appleyard, G.D., 2006. Detection of porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. *Can J Vet Res* 70, 58.

McKeown, N.E., Opriessnig, T., Thomas, P., Guenette, D.K., Elvinger, F., Fenaux, M., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2005. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 1347–51.

Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81, 2281–7.

Opriessnig, T., Meng, X-J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19, 591–615.

- Pejsak, Z., Podgórska, K., Truszczyński, M., Karbowski, P., Stadejek, T., 2010. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33, 1–5.
- Pomorska-Mól, M., Markowska-Daniel, I., Pejsak, Z., 2010. Evaluation of humoral and antigen-specific T-cell responses after vaccination of pigs against pseudorabies in the presence of maternal antibodies. *Vet Microbiol* 144, 450–4.
- Reddy, P.S., Idamakanti, N., Chen, Y., Whale, T., Babiuk, L.A., Mehtali M, Tikoo S.K., 1999. Replication-defective bovine adenovirus type 3 as an expression vector. *J Virol* 73, 9137–44.
- Renshaw, H., 1975. Influence of antibody-mediated immune suppression on clinical, viral, and immune responses to swine influenza infection. *Am J Vet Res* 36, 5–13.
- Rodríguez-Arrijoja, G.M., Segalés, J., Calsamiglia, M., Resendes, A.R., Balasch, M., Plana-Durán, J., Casal, J., Domingo, M., 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 63, 354–7.
- Rooke, J., Bland, I., 2002. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livest Prod Sci* 78, 13–23.
- Rosell, C., Segalés, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodríguez-Arrijoja, G., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M., 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 120, 59–78.

- Segalés, J., Urniza, A., Alegre, A., Bru, T., Crisci, E., Nofrarías, M., López-Soria, S., Balasch, M., Sibila, M., Xu, Z., Chu, H.J, Fraile, L., Plana-Duran, J., 2009. A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine* 27, 7313–21.
- Segalés, J., 2002. Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics. *J Swine Health Prod* 10, 277–81.
- Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 164, 10–9.
- Segalés, J., 2015. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert review of vaccines* 14, 473–87.
- Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Blanchard, P., Badiella, L., Le Dimna, M., Jestin, A., Domingo, M., 2004. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 65, 88–92.
- Suradhat, S., Damrongwatanapokin, S., Thanawongnuwech, R., 2007. Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas. *Vet Microbiol* 119, 1–9.
- Tico, G., Segalés, J., Martínez, J., 2013. The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. *Vet Microbiol* 163, 242–7.
- Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Richt, J.A., Janke, B.H., Sandbulte, M.R., Gauger, P.C., Loving, C.L., Webby, R.J., García-Sastre, A., 2012. Live attenuated influenza vaccine provides superior protection from heterologous infection in pigs with maternal

antibodies without inducing vaccine-associated enhanced respiratory disease. *J Virol* 86, 10597–605.

Von Richthofen, I., Elbers, K., Lischewski, A., Woolfenden, N., Strachan, W., 2009. The effects of vaccination against porcine circovirus type 2 on viraemia, viral load, mortality and growth in a herd affected by post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Pig J* 62, 10–26.

West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G.M., Haines D.M., Clark, E.G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Elliset, J.A., 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11, 530–2.

Young, M.G., Cunningham, G.L., Sanford, S.E., Path, D., 2011. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *J Swine Health Prod* 19, 6.





## **Capítulo 2**

**Evaluación del uso de la tecnología de nebulización para la exposición de cerdas nulíparas a *Mycoplasma hyopneumoniae* como una estrategia de aclimatación**



### RESUMEN

La exposición temprana a tejido pulmonar homogeneizado con Mhyo en cerdas nulíparas de reemplazo se ha propuesto como una potencial estrategia de aclimatación. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la eficacia de la nebulización (Neb) para la exposición de cerdas nulíparas a Mhyo en condiciones de campo.

La Fase I consistió en exponer a un homogeneizado pulmonar positivo para Mhyo (SD0) a 641 cerdas libres de Mhyo procedentes de cuatro lotes diferentes en la unidad de desarrollo de cerdas nulíparas (GDU). Las cerdas procedentes de los lotes 1 y 2 se expusieron al homogeneizado por vía intratraqueal (IT) y se usaron como referencia para los lotes 3 y 4, que se expusieron al homogeneizado a través de Neb. Se recogieron muestras con raspados traqueobronquiales (TBS) a las 2 y 4 semanas después de la exposición (SD14 y SD28, respectivamente) para evaluar el éxito de la infección mediante la técnica rt-PCR. En la fase II, 1160 cerdas correspondientes a otros tres lotes diferentes (5 a 7) se expusieron a Mhyo solo a través de Neb y se recogieron TBS el SD14.

Los resultados obtenidos en ambas fases del estudio fueron similares, no observando diferencias estadísticamente significativas en la proporción de muestras positivas a Mhyo recogidas con TBS ni tampoco se encontraron diferencias en la carga bacteriana [valor de umbral de ciclo (Ct) medio] entre los diferentes lotes de cerdas nulíparas expuestos a través de IT o Neb en ningún momento durante el experimento.

La información generada en esta investigación refuerza el uso de Neb como un método adecuado de exposición a Mhyo en condiciones de campo como. Esto implica un mayor entendimiento sobre el uso y asignación de otras estrategias que podrían completar los protocolos estándar para la aclimatación de las cerdas nulíparas a Mhyo.



### 1. INTRODUCCIÓN

Mhyo es el agente etiológico de la neumonía micoplasmal, una bronconeumonía crónica que afecta la salud de los cerdos a nivel mundial (Thacker & Minion, 2012). Mhyo predispone notablemente a los cerdos a infecciones con otras bacterias y virus respiratorios, desempeñando un papel importante en enfermedades con relevancia clínica y económica, conocidas como neumonía enzoótica (NEP) y el complejo respiratorio porcino (PRDC) (Thacker & Minion, 2012). A pesar de todos los esfuerzos implementados para reducir el impacto económico, estas enfermedades siguen todavía asociadas a una importante pérdida económica en la industria porcina.

Aunque el contacto indirecto también tiene importancia en la infección de Mhyo, el contacto directo de nariz a nariz entre cerdos infectados y susceptibles se considera la principal vía de transmisión (Fano et al., 2005). La primera exposición a Mhyo puede ocurrir durante la lactancia, cuando los lechones están en contacto con las cerdas (Calsamiglia & Pijoan, 2000; Nathues et al., 2013a,b). Varios estudios han demostrado que los lechones pueden ser colonizados por dicha bacteria durante el período de lactancia, resultando positivos por PCR a Mhyo al ser destetados (Fano et al., 2007; Sibila et al., 2007; Villarreal et al., 2010; Pieters et al., 2014). Además, se ha demostrado que existe una correlación entre la gravedad de la enfermedad durante el crecimiento de los cerdos y la prevalencia de lechones positivos a Mhyo en el momento del destete (Fano et al., 2007; Sibila et al., 2008).

Se cree que la circulación de Mhyo se produce entre las cerdas presentes en el hato reproductor y se transmite a las cerdas entrantes (Calsamiglia et al., 2000). Dado que la excreción o liberación de Mhyo ocurre principalmente en la fase aguda de la infección (Pieters et al., 2009), las cerdas nulíparas y las de baja paridad infectadas por primera vez se consideran la fuente principal de transmisión de la bacteria a los lechones lactantes

(Calsamiglia & Pijoan, 2000; Fano et al., 2007). Esto último, junto con la a persistencia de Mhyo de hasta 214 días después de la infección (Pieters et al., 2009) y el hecho de que aproximadamente el 20% de las cerdas nulíparas pueden permanecer negativas a la infección a lo largo del tiempo (Takeuti et al., 2017a,b), hacen que sea de suma importancia la implementación de un adecuado proceso de aclimatación temprana de la cerda nulípara contra Mhyo. Esta aclimatación ayudaría a minimizar la colonización de sus futuros lechones y evitar así problemas respiratorios posteriores en las fases de crecimiento.

La vacunación es la estrategia principal utilizada para realizar los procedimientos de aclimatación contra Mhyo en las cerdas de reemplazo tanto en Europa como en América del Norte, aunque otra estrategia de aclimatación utilizada con frecuencia es la exposición natural de las mismas a cerdas con sospecha de infección (Fano et al., 2015; Centeno et al., 2016; Garza-Moreno et al., 2017). La exposición uniforme a Mhyo es difícil de lograr ya que la transmisión es muy lenta (Meyns et al., 2004; Roos et al., 2016). Con el fin de aumentar el éxito de la exposición, recientemente se ha estudiado el uso de tejido pulmonar homogeneizado con Mhyo para infectar deliberadamente a las cerdas de reemplazo en los EE. UU. (Fano et al., 2015) y en México (Centeno et al., 2016).

La exposición controlada de las cerdas nulíparas al material infeccioso de Mhyo podría ser un método complementario en su aclimatación, lo cual, requiere una mayor investigación. El método IT es el más utilizado en los procedimientos de inoculación experimental de Mhyo (García-Morante et al., 2017). Sin embargo, debido al desafío que supone la aplicación a gran escala de este método en la industria porcina, el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de la exposición a Mhyo por nebulización (Neb) en cerdas nulíparas, en condiciones de campo, como estrategia de aclimatación de las futuras reproductoras.

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Animales y manejo

El estudio se realizó entre julio de 2017 y junio de 2018 en una unidad de desarrollo de 2200 cerdas nulíparas (GDU) ubicada en Aragón (España). Esta explotación consta de dos edificios de 854 m<sup>2</sup> organizados en dos unidades de 420 m<sup>2</sup> cada una; las cerdas nulíparas (cruce genético convencional de *Landrace x Large White*) se dividieron en grupos de 10 y se alojaron en corrales de 9 m<sup>2</sup> dentro de la misma unidad. La GDU trabajaba con lotes de cerdas nulíparas a demanda de las granjas y utilizaba un sistema de manejo de todo dentro todo fuera por unidad. La alimentación y el agua estaban disponibles “*ad libitum*” en comederos de acero inoxidable y a través de bebederos de cazoleta, respectivamente. El suelo de las instalaciones era de hormigón enrejillado y se les daba una dieta para satisfacer sus necesidades nutricionales. Todos los animales estaban bajo supervisión y cuidado veterinario con una certificación de bienestar basada en *Welfare Quality*<sup>®</sup> (certificación de bienestar animal de AENOR).

El peso corporal aproximado de las futuras reproductoras a la entrada de la GDU fue de 20 kg y a la salida el peso fue de aproximadamente 100 kg. Todas las cerdas se obtuvieron de una única granja de multiplicación que era negativa a Mhyo, siendo también negativa a PRRS y al virus de la Influenza A. El programa de vacunación aplicado incluía la inmunización contra el virus del PRRS, el virus de la enfermedad de Aujeszky, el virus de la Influenza A, el Parvovirus porcino, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PCV-2 y Mhyo así como una revacuna de recuerdo a las 25 semanas de edad. Antes del inicio del estudio, no se observaron signos de ninguna enfermedad importante en los animales.

## 2.2. Diseño experimental y recogida de muestras

Esta investigación se realizó en dos fases: fase I con un total de 641 cerdas nulíparas procedentes de 4 lotes (1-4) y fase II con 1160 cerdas nulíparas procedentes de 3 lotes (5-7). El diseño experimental se presenta en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Las cerdas nulíparas de siete lotes diferentes, procedentes de 2 fases de estudio y formados por un número variable de animales, fueron expuestas artificialmente a Mhyo. Dentro de cada lote, un grupo de cerdas nulíparas (n = 30) se muestreó mediante TBS para la detección de Mhyo mediante rt-PCR en diferentes días a lo largo del estudio (SD14, SD28).

Fase del estudio	Nº. Lote	Nº. de animales	Inoculación SD0	TBS	
				SD14	SD28
I	1	88	IT	x	x
	2	120	IT	x	x
	3	120	Neb	x	x
	4	120	Neb	x	x
II	5	370	Neb	x	---
	6	386	Neb	x	---
	7	404	Neb	x	---

Nº = número de animales; SD: día del estudio; IT: intra-traqueal; Neb: nebulización; TBS: raspados traqueobronquiales.

En todos los casos, los lotes fueron formados por un número variable de animales y la exposición a Mhyo se realizó en el SD0 en cerdas de 10-13 semanas de edad. En la fase I, la bacteria se inoculó a través de IT en los lotes 1 y 2, estos se utilizaron como controles positivos para los lotes 3 y 4 que fueron expuestos al patógeno por Neb. En la fase II, todos los lotes (5-7) se expusieron a Mhyo a través de Neb. En cada lote, un subgrupo de 30 cerdas fue monitoreado aleatoriamente para confirmar la infección durante la fase aguda de la misma. Para ello, se recogieron TBS a las 2 y 4 semanas después del día de la exposición (SD14 y SD28, respectivamente) en la fase I, y en el SD14 en la fase II.



### 2.3. Material infeccioso de Mhyo

El material infeccioso usado para los lotes 1 y 2 se obtuvo de una granja comercial de producción de lechones a 6 kg. Esta granja manifestaba problemas de NEP en la entrada de las cerdas de reemplazo y en las etapas finales del engorde de los cerdos. La explotación recibía las cerdas nulíparas desde la GDU descrita anteriormente. Se seleccionaron diez cerdas nulíparas de 24 semanas de edad clínicamente afectadas y se muestrearon con TBS. El donante del material bacteriano se designó en base al umbral del ciclo más bajo (Ct) para Mhyo y la presencia mínima de otros patógenos respiratorios porcinos según lo determinado por rt-PCR y descrito por otros autores (Robbins et al., 2019). Posteriormente, la cerda donante seleccionada se sacrificó humanitariamente y se sometió a una necropsia, de modo que se usó el pulmón para preparar el tejido homogeneizado conteniendo la bacteria infecciosa (Robbins et al., 2019). Para los lotes 3 y 4, se sacrificaron humanitariamente siete cerdas nulíparas de la GDU infectadas de forma artificial con Mhyo (lote 1) y posteriormente se hizo la necropsia. Los donantes del material bacteriano se seleccionaron en base a los mismos criterios mencionados anteriormente, aunque se realizó a partir de los resultados del tejido pulmonar obtenidos por rt-PCR. En este caso, se seleccionaron pulmones de tres cerdas nulíparas para proceder a la preparación del homogeneizado pulmonar con la bacteria. Por último, para la preparación del homogeneizado bacteriano del pulmón en los lotes 5, 6 y 7 se utilizaron pulmones de diez cerdas nulíparas descartadas como futuras reproductoras pertenecientes a lotes anteriores de GDU expuestos a Mhyo. En todos los casos, los tejidos homogeneizados con la bacteria se prepararon aproximadamente con una proporción de 6 g de tejido pulmonar cada 4 ml de medio Friis de micoplasma. Posteriormente, se confirmó que eran positivos a Mhyo y se almacenaron en alícuotas de 30 ml a -80 °C hasta su uso. Los resultados de las pruebas realizadas frente a los diferentes patógenos en los

## Capítulo 2

tres homogeneizados de pulmón quedan reflejados en la Tabla 2. Los donantes del material bacteriano se designaron en base en al valor de Ct más bajo para Mhyo y a la presencia mínima de otros potenciales patógenos respiratorios porcinos.

**Tabla 2.** Patógenos analizados en tejido pulmonar homogeneizado con Mhyo para su exposición en cerdas nulíparas.

Bacteria y virus probados	Lotes 1 y 2		Lotes 3 y 4		Lotes 5, 6 y 7	
	Resultados	Valor Ct	Resultados	Valor Ct	Resultados	Valor Ct
PRRSV-1*	-		+	32.89	-	
PRRSV-2	-		-		-	
Virus Influenza A	-		-		-	
Circovirus porcino 2	-		-		-	
<b>Mhyo</b>	<b>+</b>	<b>23.82</b>	<b>+</b>	<b>23.90</b>	<b>+</b>	<b>20.99</b>
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	-		+	25.98	-	
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	-		-		+	33.56
<i>Streptococcus suis</i>	-		-		-	
<i>Pasteurella multocida</i>	+	26.36	-		+	33.24
<i>Haemophilus parasuis</i>	-		-		-	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-		-		-	

(+): positivo mediante rt-PCR; (-): negativo mediante rt-PCR; \* > 98% en homología en el marco de lectura abierta 5 (ORF5) entre la vacuna de PRRSV utilizada en la GDU y la secuencia encontrada en el pulmón donante.

### 2.4. Inoculación de Mhyo

A las cerdas nulíparas procedentes de los lotes 1 y 2 (fase I) se les inoculó el patógeno una única vez vía IT con 10 ml del homogeneizado. Los inóculos se prepararon con el correspondiente tejido pulmonar homogeneizado a una dilución de 1:50 en medio Friis micoplásmico y a una concentración final de  $4.6 \times 10^6$  copias de genoma/ml, según lo determinado por la rt-PCR. La técnica de inoculación se realizó de manera similar a la descrita anteriormente por Pieters y colaboradores (Pieters et al., 2008), sin el uso de

anestesia, utilizando un catéter de inseminación post-cervical (Magaplus; MAGAPOR, S.L.; Zaragoza, España) para la aplicación de homogeneizado pulmonar en la tráquea, y un laringoscopio y un abre bocas para la visualización. Para la realización de la Neb, se utilizó un aplicador de aerosol portátil eléctrico (Hurricane™ Ultra; CURTIS DYNA-FOG® Ltd.; Jackson, GA, EE. UU.). En la exposición de las cerdas nulíparas procedentes de los lotes 3-7 (fase I y II) a Mhyo a través de Neb, los inóculos se prepararon con el tejido pulmonar homogeneizado a una dilución de 1:50 en medio Friis micoplásmico y se filtraron para descartar restos de tejido para evitar el mal funcionamiento del equipo. En la fase I, la concentración final de inóculos de Mhyo fue de  $6.6$  y  $8.9 \times 10^6$  copias del genoma/ml en los lotes 3 y 4, respectivamente. En la fase II, la concentración final del inóculo fue de  $1.1 \times 10^4$ ,  $2.1 \times 10^5$  y  $1.6 \times 10^7$  copias del genoma/ml en los lotes 5, 6 y 7, respectivamente. El material infeccioso se administró con una velocidad de salida total de aproximadamente 236 ml/min a una corriente de 220 voltios durante 2 minutos aproximadamente en cada cuadra que alberga 10 cerdas. Los tamaños de partícula generados oscilaron entre 7 y 30  $\mu\text{m}$  de diámetro medio en volumen (VMD), dependiendo del caudal y la viscosidad de los inóculos. Durante el procedimiento de Neb, todas las ventanas de la unidad se cerraron para evitar flujos de aire que pudieran interferir en la exposición de las cerdas al material infeccioso. Además, todo el personal que podría estar expuesto al aerosol usó equipo de protección personal, que incluían mascarilla (3M™ 4279 máscaras de media cara reutilizables; 3M; Berkshire, Reino Unido) y gafas (3M™ GoggleGear™ 500 Series GG501SGAF; St. Paul, MN, EE. UU.).

### **2.5. Recolección de muestras, procesamiento y pruebas**

Se obtuvieron muestras a través de TBS tal y como describieron previamente Fablet y colaboradores (Fablet et al., 2010). Se usó un lazo de sujeción para las cerdas nulíparas, y posteriormente se utilizó un abre bocas y un laringoscopio para la visualización. En este caso, también se usó un catéter de inseminación post-cervical para alcanzar la bifurcación traqueo-bronquial donde se recogió el moco a través de un movimiento suave del catéter. La punta del catéter (2 cm de diámetro) se colocó en un tubo BD Serum Vacutainer® de 5 ml (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.), se mezcló con 2 ml de solución salina estéril y se refrigeró hasta la prueba. Se recogieron TBS individuales que posteriormente se unieron en grupos de 5 dentro de cada lote y punto de muestreo. Todos los grupos se analizaron mediante una rt-PCR específica para Mhyo (EXOone Mhyo oneMIX qPCR, EXOPOL S.L.U, Zaragoza, España), la cual fue validada usando un kit de purificación de ADN (UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit, MOBIO Lab, Inc., Carlsbad, CA, EE. UU.) para la extracción de ADN. Se consideró positiva una muestra para la detección de Mhyo cuando el valor de Ct era menor de 38.

### **2.6. Análisis de los datos**

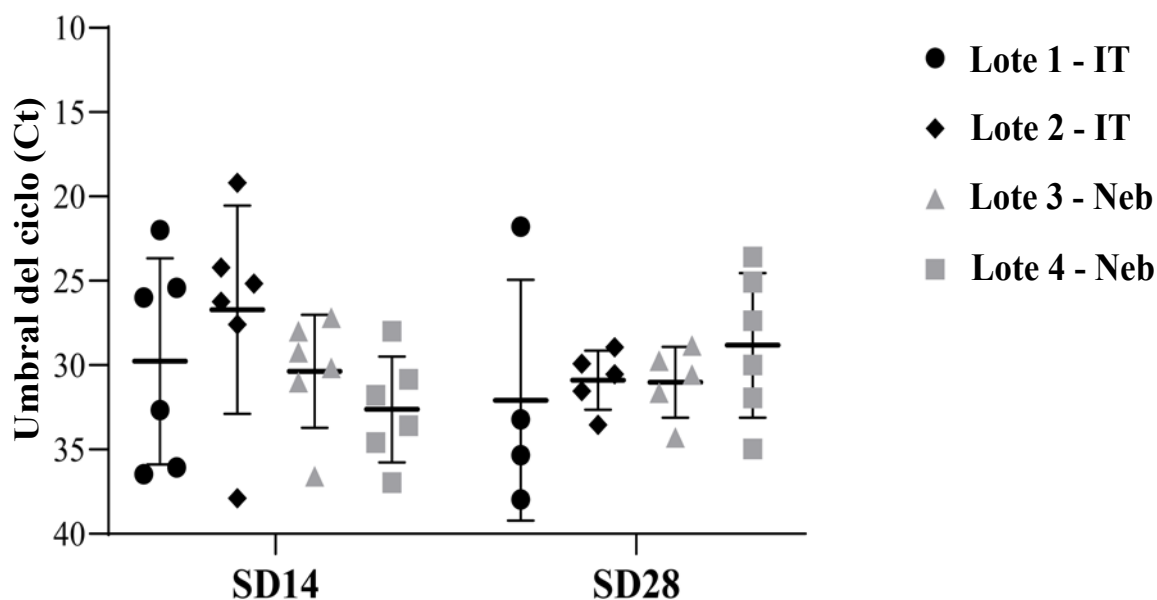
Los análisis estadísticos y los resúmenes de datos se realizaron con el software Graph Pad Prism 8. Todos los datos se resumieron descriptivamente en función del tipo de variable y se analizaron asumiendo una estructura de diseño completamente aleatoria. Para comparar los valores medios de Ct procedentes de la rt-PCR de los lotes de cerdas nulíparas se realizó un análisis de varianza a través de un ANOVA de una vía ordinario en diferentes puntos de muestreo (SD14 y SD28). La prueba de Chi cuadrado se utilizó para evaluar la proporción de muestras positivas de la rt-PCR entre grupos en diferentes puntos de muestreo. Las diferencias significativas se diseñaron a través de pruebas de 2 colas en  $\alpha = 0.05$ , con diferencias consideradas significativas si  $p \leq 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.2. Detección de Mhyo en TBS

##### 3.2.1. Fase I: Lotes expuestos mediante IT o Neb

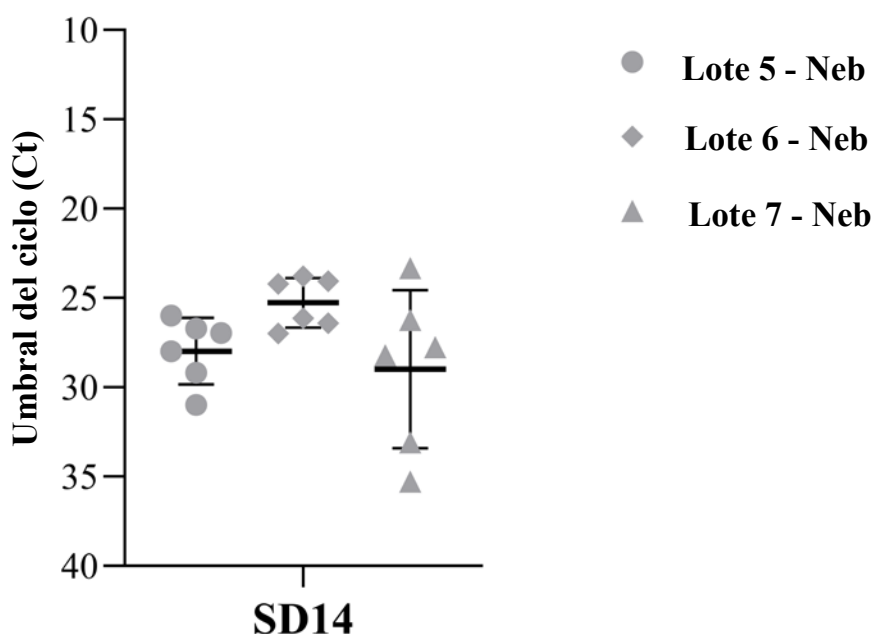
Los valores de Ct de las muestras positivas recogidas con TBS en la fase aguda (SD14 y SD28) de los lotes 1-4 se muestran en la Figura 1. En general, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de muestras de TBS positivas o en la carga bacteriana (valor medio de Ct) entre los lotes de cerdas en ningún momento. En SD14, todas las muestras fueron positivas para Mhyo en todos los lotes, independientemente del método de exposición (es decir, IT o Neb). En SD28, el 66.7% (4 de 6) de muestras recogidas con TBS fueron positivas a Mhyo en el lote 1, el 83.3% (5 de 6) en los lotes 2 y 3, y el 100 % (6 de 6) en el lote 4.



**Figura 1.** Recogida de muestras a través de TBS en la segunda (SD14) y cuarta (SD28) semana tras la exposición a Mhyo (Fase I). Valor individual de Ct y media  $\pm$  desviación estándar de las muestras positivas en TBS usando la prueba de rt-PCR para Mhyo. Resultados de los lotes 1 y 2 inoculados por vía intratraqueal (IT) y lotes 3 y 4 expuestos por nebulización (Neb).

3.2.2. Fase II: Lotes expuestos mediante Neb

Los valores de Ct de las muestras positivas recogidas con TBS en la fase aguda de la infección (SD14) de los lotes 5-7 se muestran en la Figura 2. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de muestras positivas recogidas con TBS o en la carga bacteriana entre los lotes en el SD14. Al igual que en la fase I, las muestras fueron positivas a Mhyo en todos los lotes después de dos semanas de la exposición (SD14).



**Figura 2.** Recogida de muestras a través de TBS a las dos semanas (SD14) después de la exposición a Mhyo (Fase II). Valor individual de Ct y media  $\pm$  desviación estándar de muestras positivas en TBS usando la prueba de rt-PCR para Mhyo. Resultados de los lotes 5, 6 y 7 expuestos por nebulización (Neb).

**4. DISCUSIÓN**

Debido al hecho de que las cerdas nulíparas podrían ser la principal fuente de Mhyo en los cerdos recién nacidos (Calsamiglia & Pijoan, 2000; Fano et al., 2005), se ha sugerido una adecuada aclimatación de este tipo de cerdas centrada en reducir la excreción bacteriana en el primer parto (Pieters & Fano, 2016). La información sobre las estrategias de aclimatación de cerdas de remplazo a Mhyo es limitada. Recientemente, se ha señalado

en una revisión que la vacunación es la principal estrategia utilizada en U.E., México y los EE.UU. (Garza-Moreno et al., 2018), y se ha descrito el uso de homogeneizado de pulmón para ese propósito (Robbins et al., 2019). La vacunación contra Mhyo como aclimatación en cerdas nulíparas puede ser efectiva para disminuir ligeramente la excreción bacteriana y la infección (Garza-Moreno et al., 2019), sin embargo, los estudios en condiciones experimentales (Meyns et al., 2006) y de campo (Pieters et al., 2010; Villareal et al., 2010) mostraron que la vacunación no evitó la transmisión del patógeno.

Por lo tanto, para controlar el momento de infección a Mhyo y minimizar la probabilidad de excreción de la bacteria en el primer parto, se propuso la exposición controlada temprana al patógeno en cerdas nulíparas de reemplazo mediante la administración de tejido pulmonar homogeneizado que contenía Mhyo (Fano & Payne, 2015; Centeno et al., 2016; Nickel et al., 2018; Robbins et al., 2019). La inoculación con tejido pulmonar homogeneizado preparado a partir de cerdos infectados podría tener el potencial riesgo de introducir agentes adventicios y agravar la respuesta inflamatoria debido a la administración de antígenos extraños (Czaja et al., 2002). Si bien el uso de cultivo puro de Mhyo evitaría lo mencionado anteriormente, el cultivo bacteriano sigue siendo un desafío y requiere de un tiempo excesivo (Cook et al., 2016). Además, el uso del aislamiento bacteriano en granja podría repercutir en aspectos legales.

La inoculación bacteriana a través de IT se ha utilizado ampliamente en entornos experimentales (García-Morante et al., 2017), probablemente debido al hecho de que por esta vía se puede proporcionar un mayor volumen de inóculo en el tracto respiratorio inferior del cerdo, logrando mayores dosis infecciosas en tiempos más cortos y promoviendo una colonización más temprana de Mhyo (García-Morante et al., 2016). Sin embargo, la aplicación de IT requiere una alta mano de obra, consume mucho tiempo y es invasiva. En la práctica, estos factores representan un gran desafío para la

implementación de este método a gran escala en la industria porcina. Otra opción sería la exposición controlada de las cerdas nulíparas a animales infectados. Roos y colaboradores (Roos et al., 2016) concluyeron que para una exposición exitosa a Mhyo se necesitaron 6 animales infectados a través de IT en un grupo de 10 cerdas en un período de exposición de 4 semanas. Debido a la alta proporción de animales infectados necesarios y la inviabilidad de la metodología de IT en condiciones de campo, se buscan alternativas prácticas para garantizar la exposición a Mhyo. Aunque se supone que Neb se asemeja a las condiciones naturales de infección por este patógeno, también puede implicar algunas limitaciones, como problemas de bioseguridad y biocontención, o una menor precisión de dosificación. En un trabajo reciente, los cerdos inoculados por IT mostraron una colonización significativamente más temprana del tracto respiratorio superior de Mhyo en comparación con los inoculados a través de Neb (exposición individual a través de una máscara de inhalación) (García-Morante et al., 2016). Este hallazgo podría sugerir un cierto retraso en la dinámica de infección por Mhyo determinada, en parte, por el método de exposición al patógeno. El presente estudio evalúa la validez de Neb para exponer a Mhyo intencionadamente a cerdas nulíparas en un contexto de campo. En este marco, la eficacia de la exposición se evaluó principalmente mediante rt-PCR sobre muestras agregadas de 5 TBS por cada determinación, inmediatamente después de la exposición (SD14 y SD28).

El muestreo a través de TBS en combinación con pruebas de rt-PCR para detectar Mhyo se ha propuesto como una técnica innovadora para detectar consistentemente el patógeno en diferentes contextos (Fablet et al., 2010; Vangroenweghe et al., 2015a,b, 2018a,b; Sponheim et al., 2020). De hecho, se ha sugerido que el TBS es la muestra antemortem más sensible disponible para evaluar la prevalencia de Mhyo en una población porcina (Vangroenweghe et al., 2015b; Sponheim et al., 2020). En nuestro



estudio, se recolectaron 30 TBS por lote y día de muestreo. Este tamaño de muestra se usa ampliamente en el campo para detectar al menos un positivo de una población de 1000 cerdos, suponiendo una prevalencia del 10% y un intervalo de confianza del 95% (Thrusfield et al., 2001). Aplicando esto a la presente investigación, se habría detectado al menos un cerdo expuesto negativo por lote utilizando este tamaño de muestra. Sin embargo, con el fin de reducir significativamente el número de pruebas y los costos asociados, se enviaron muestras para su análisis en grupos de cinco. Si bien este paso de dilución se ha propuesto como el enfoque preferencial para los estudios de campo que recolectan TBS (Vangroenweghe et al., 2015b; Chapman et al., 2018; Hewitt et al., 2020), agrupar a más de un animal para cada determinación minimiza los efectos de la variación biológica entre individuos. En este contexto donde se espera una alta prevalencia y bajos valores de Ct, existe el riesgo de no detectar animales negativos en una muestra agregada. Sin duda, esto puede entenderse como una limitación del estudio, ya que puede dar una falsa confianza con respecto a los resultados de rt-PCR estando agrupados. Sin embargo, hay evidencias en la literatura que demuestran que es improbable que las muestras positivas agrupadas de este estudio estén compuestas principalmente por TBS individuales negativos. Sponheim y colaboradores (Sponheim et al., 2020) mostraron que la incidencia acumulada de infección por Mhyo, en un muestreo con TBS individual, fue del 100% aproximadamente 14 semanas después de la infección en cerdos inoculados por vía IT. Un trabajo anterior usando un nebulizador mecánico para exponer a las primerizas a Mhyo mostró el 100% de TBS individuales positivos entre 8 y 11 semanas después de la Neb (Nickel et al., 2018). Más recientemente, el 100% de TBS agrupadas fueron PCR positivas a Mhyo a los 14 días después de la infección en cerdos también expuestos por Neb (Hewitt et al., 2020). En este último caso, todas las muestras se analizaron individualmente y se confirmó que todas las muestras eran positivas a PCR.

En general, los datos obtenidos en el presente estudio respaldan la idea de que Neb puede ser una metodología sencilla y efectiva para exponer a las primerizas a Mhyo con fines de aclimatación. Las muestras agregadas de los TBS tras la exposición no revelaron diferencias estadísticamente significativas ni en la proporción de positivos ni en las cargas bacterianas medias, entre los lotes expuestos a través de IT o Neb. A pesar de que la prevalencia real de los animales negativos a Mhyo después de la exposición no pudo ser abordada, las únicas muestras de TBS agregadas que dieron negativo fueron tomadas en SD28 de cerdas expuestas vía IT. Debido al alto rendimiento de la sensibilidad analítica de la rt-PCR, todos los individuos dentro de los grupos negativos generalmente se consideran negativos. Sin embargo, utilizando PRRS como un ejemplo, aproximadamente el 6% de las muestras que se detectarían por PCR de transcripción inversa en suero individual se perderían si se procesaran en grupos de 5 muestras (Rovira et al., 2007). En los fluidos procedentes del procesado de los lechones (corte de rabos y testículos), las muestras con valores iniciales de Ct de 35 se sitúan por encima del umbral de positividad a mayor dilución (Vilalta et al., 2019). Para Neb, todas las muestras de TBS agrupadas fueron positivas para el patógeno en todos los lotes y día de muestreo. Las muestras agregadas que dan positivo indican que al menos un individuo dentro de cada grupo es positivo, y se necesitaría una nueva prueba individual de cada muestra para discernir entre positivos y negativos. Desafortunadamente, la reevaluación de muestras individuales de TBS no se pudo realizar en este estudio ya que las muestras ya no estaban disponibles. Además, no existe literatura que evalúe los cambios en los valores de Ct de los grupos de TBS positivos a Mhyo por efecto de la presencia de muestras negativas en el grupo. En consecuencia, la existencia de subpoblaciones negativas después de la exposición a Mhyo por la tecnología Neb no puede descartarse. La influencia de estas subpoblaciones negativas tras la exposición sobre la eficacia de las estrategias de

aclimatación en términos de reducción de la excreción de Mhyo y, en consecuencia, sobre la prevalencia de la enfermedad en su descendencia, no ha sido explorada y debería, por tanto, abordarse en futuros trabajos. Otro escenario sería un rebaño sometido a un protocolo de eliminación de Mhyo. En este caso, la presencia de subpoblaciones susceptibles representa un riesgo importante para el fracaso del programa (Holst et al., 2015), lo que enfatiza la necesidad de desarrollar protocolos de diagnóstico precisos para determinar el éxito de la exposición a Mhyo. En resumen, se necesitan protocolos de diagnóstico personalizados para alcanzar el objetivo perseguido con cada estrategia de aclimatación, que puede ser el control (baja prevalencia) o la erradicación de la infección.

Además de la metodología de inoculación, se observó una exposición exitosa a Mhyo, independientemente de la concentración bacteriana del inóculo. Si bien se obtuvieron diferentes valoraciones (expresadas como copias del genoma/ml) de tejidos pulmonares homogeneizados finales, no se detectaron diferencias significativas en la proporción de positividad o en las cargas bacterianas de las muestras agregadas de TBS entre ninguno de los lotes. Aunque es probable que intervengan muchos otros factores, la rt-PCR no es indicativa de la viabilidad de la bacteria en el inóculo, ya que los fragmentos de ADN están presentes en el cultivo durante largos períodos de tiempo incluso cuando las células de Mhyo ya no son viables (García-Morante et al., 2018).

Los cerdos infectados con Mhyo a través de IT pueden liberar la bacteria hasta 214 días después de la infección inicial (Pieters et al., 2009), aunque su duración podría ser potencialmente más corta en las cerdas nulíparas infectadas de forma natural en condiciones de campo (Garza-Moreno et al., 2019). En este estudio no se obtuvieron datos de excreción tardía de la bacteria después de la exposición. Para la exposición por Neb la información respecto al patrón de excreción en términos de duración y carga bacteriana también falta en la literatura. Por lo tanto, debería ser objeto de investigaciones

adicionales. En relación con esto, la exposición a edad temprana tiene gran importancia cuando el objetivo es obtener cerdas que no excreten Mhyo en el momento del primer parto. Las nulíparas del presente estudio ingresaron y abandonaron el GDU aproximadamente a las 7 y 28 semanas de edad, respectivamente. Considerando una duración de excreción bacteriana de 214 días ( $\approx 31$  semanas) tras la infección, y que la edad en el primer apareamiento de las hembras nulíparas en nuestro estudio fue aproximadamente a las 35 semanas, el proceso de aclimatación utilizado que comenzó en nuestro estudio a las 10 -13 semanas de edad, debería haber asegurado la ausencia de la eliminación de Mhyo en el primer parto, como sugieren Pieters y Fano (Pieters & Fano, 2016). Lamentablemente, no se verificó el estatus de excreción de Mhyo de las primerizas en el primer parto, por lo tanto, la eficacia de este protocolo de aclimatación para reducir la excreción de bacterias en ese momento crítico sigue siendo desconocido. Además, existen numerosos factores que probablemente podrían afectar la duración de la excreción de Mhyo, por ejemplo, el estado inmunológico de los animales infectados. Es importante tener en cuenta que las cerdas nulíparas utilizadas en este estudio fueron vacunadas contra Mhyo antes de su ingreso al GDU. Se ha descrito en un estudio reciente que, en cerdas infectadas de forma natural en condiciones de campo, parecía existir una menor excreción de Mhyo cuando estas eran vacunadas comparado a cuando no lo eran (Garza-Moreno et al., 2019). Sin embargo, los muestreos tan espaciados en el tiempo que presenta este estudio (13 semanas) no permitieron conocer con exactitud el momento de infección de cada lote. Por tanto, este efecto positivo de la vacunación sobre el patrón de excreción debería corroborarse en animales inoculados experimentalmente, en los que se conozca el momento exacto de exposición a Mhyo. De confirmarse esta hipótesis, el protocolo que incluyese la exposición homogénea de cerdas vacunadas podría ser ventajoso en la reducción de los tiempos de aclimatación.

La introducción de cerdas nulíparas negativas a Mhyo en granjas de reproductoras positivas a la bacteria es una práctica muy común y se necesitan esfuerzos importantes para controlar la transmisión vertical de este patógeno. En este contexto, la exposición controlada de las cerdas nulíparas al material infeccioso de Mhyo podría ser un método complementario para su aclimatación. Bajo las condiciones del presente estudio, Neb podría usarse para exponer a los animales a Mhyo. Estos resultados podrían ayudar a desarrollar protocolos exitosos para la exposición de cerdas nulíparas a este patógeno, pudiendo ser un primer paso para su aclimatación antes de ingresar a la granja de reproducción y conseguir así un control sostenible de la enfermedad respiratoria a lo largo del tiempo.

### 5. REFERENCIAS

- Calsamiglia, M., Collins, J.E., Pijoan, C., 2000. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. *Vet Microbiol* 76, 299-303.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C., 2000. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Vet Rec* 146, 530 - 532.
- Centeno, N., Chévez, J., Fano, E., 2016. Mexican swine industry on *Mycoplasma hyopneumoniae* gilts acclimatation. *Proceedings of the 24<sup>th</sup> IPVS Congress*, 241.
- Chapman, B., EVELSIZER, R., PIETERS, M., 2018. Putting to test a diagnostic protocol for confirmation of *Mycoplasma hyopneumoniae* elimination in sow farms. *Proceedings of the 49<sup>th</sup> AASV Annual Meeting*, 81-82
- Cook, B.S., Beddow, J.G., Manso-Silvan, L., Maglennon, G.A., Rycroft, A.N., 2016. Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 195, 158-164.
- Czaja, T., Kanci, A., Lloyd, L.C., Markham, P.F., Whithear, K.G., Browning, G.F., 2002. Induction of enzootic pneumonia in pigs by the administration of an aerosol of in vitro-cultured *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Rec* 150, 9-11.
- Fablet, C., Marois, C., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N., 2010. Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Vet Microbiol* 143, 238-245.
- Fano, E., Payne, B., 2015. *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt acclimation and sow herd stability: Essentials to the systematic control approach. *Proceedings of the 46<sup>th</sup> AASV anual meeting*, 175-177.

- 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.
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., 2005. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Can J Vet Res* 69, 223-228.
- Garcia-Morante, B., Dors, A., León-Kempis, R., Pérez De Rozas, A., Segalés, J., Sibila, M., 2018. Assessment of the in vitro growing dynamics and kinetics of the non-pathogenic J and pathogenic 11 and 232 *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet Res* 49, 45.
- 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. *Vet Res* 47, 1.
- Garcia-Morante, B., Segalés, J., Serrano, E., Sibila, M., 2017. Determinants for swine mycoplasmal pneumonia reproduction under experimental conditions: A systematic review and recursive partitioning analysis. *PLoS One*. 12, 7.
- Garza-Moreno, L., Pieters, M., López-Soria, S., Carmona, M., Krejci, R., Segalés, J., Sibila, M., 2019. Comparison of vaccination protocols against *Mycoplasma hyopneumoniae* during the gilt acclimation period. *Vet Microbiol* 229, 7-13.
- Garza-Moreno, L., Segalés, J., Pieters, M., Romagosa, A., Sibila, M., 2018. Acclimation strategies in gilts to control *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet Microbiol* 219, 23-29.
- Garza-Moreno, L., Segalés, J., Pieters, M., Romagosa, A., Sibila, M., 2017. Survey on *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt acclimation practices in Europe. *Porc Heal Manag* 3, 21.

- Holst, S., Yeske, P., Pieters, M., 2015. Elimination of *Mycoplasma hyopneumoniae* from breed - to - wean farms: A review of current protocols with emphasis on herd closure and medication. J Swine Heal Prod 23, 321-330.
- Meyns, T., Dewulf, J., de Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F., Maes, D., 2006. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. Vaccine 24, 7081-7086.
- Meyns, T., Maes, D., Dewulf, J., Vicca, J., Haesebrouck, F., Kruif, A. De., 2004. Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. Prev Vet Med 66, 265-275.
- Nathues, H., Doehring, S., Woeste, H., Fahrion, A., Doherr, M., Grosse Beilage, E., 2013b. Individual risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. Acta Vet Scan 3, 44.
- Nathues, H., Woeste, H., Doehring, S., Fahrion, A.S., Doherr, M.G., Grosse Beilage, E., 2013a. Herd specific risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. Acta Vet Scand 55, 30.
- Nickel, M., Toohill, E., Lehman, J., 2018. Use of a hurricane fogger for *Mycoplasma hyopneumoniae* inoculation in nursery age gilts. Proceedings of the 49<sup>th</sup> AASV Annual Meeting, 97-98.
- Pieters, M., Cline, G.S., Payne, B.J., Prado, C., Ertl, J.R., Rendahl, A.K., 2014. Intra-farm risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age. Vet Microbiol. 172, 575-580.
- 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. Can J Vet Res. 74, 157-160.



- Pieters, M., Fano, E., 2016. *Mycoplasma hyopneumoniae* management in gilts. *Vet Rec* 178, 122-123.
- Pieters, M., Pijoan, C., Fano, E., Dee, S., 2009. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Vet Microbiol* 134, 261-266.
- Robbins, R.C., Betlach, A.M., Mondragon-Evans, M.R., Pieters, M., 2019. Development of a herd-specific lung homogenate for exposure to *Mycoplasma hyopneumoniae* under field conditions. *J Swine Heal Prod* 27, 221-227.
- Roos, L.R., 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. *Vet Microbiol* 184, 51-58.
- Rovira, A., Clement, T., Christopher-Hennings, J., Thompson, B., Engle, M., Reicks, D., Muñoz-Zanzi, C., 2007. Evaluation of the sensitivity of reverse-transcription polymerase chain reaction to detect porcine reproductive and respiratory syndrome virus on individual and pooled samples from boars. *J Vet Diagnostic Investig* 19, 502-9.
- Sibila, M., Bernal, R., Torrents, D., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia, M., Segalés, J., 2008. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Vet Microbiol* 127, 1.
- Sibila, M., Nofrarías, M., López-Soria, S., Segalés, J., Riera, P., Llopart, D., Calsamiglia, M., 2007. Exploratory field study on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. *Vet Microbiol* 121, 3.

- Sponheim, A., Alvarez, J., Fano, E., Schmaling, E., Dee, S., Hanson, D., Wetzell, T., Pieters, M., 2020. Comparison of the sensitivity of laryngeal swabs and deep tracheal catheters for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally and naturally infected pigs early and late after infection. *Vet Microbiol* 241, 108500.
- Takeuti, K.L., de Barcellos, D., de Andrade, C.P., de Almeida, L.L., Pieters, M., 2017<sup>a</sup>. Infection dynamics and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* in self-replacement gilts. *Vet Microbiol* 208, 18-24.
- Takeuti, K.L., de Barcellos, D., de Lara, A.C., Kunrath, C.F., Pieters, M., 2017<sup>b</sup>. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. *Vet Microbiol* 203, 215-220.
- Thacker, E.L., Minion, C.F., 2012. Mycoplasmosis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., eds. *Diseases of Swine*. 10<sup>th</sup> ed. Ames, IA: Wiley - Blackwell; 779 - 798.
- 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.
- 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<sup>a</sup>. 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. *J Vet Diagnostic Investig* 27, 606-610.
- Vangroenweghe, F., Labarque, G.G., Piepers, S., Strutzberg-Minder, K., Maes, D., 2015<sup>b</sup>. *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in peri-weaned and post-weaned pigs in

Belgium and The Netherlands: Prevalence and associations with climatic conditions. Vet J 205, 93-97.

Vangroenweghe, F., Willems, E., Malášek, J., Thas, O., Maes, D., 2018a. Use of trachea-bronchial swab qPCR testing to confirm *Mycoplasma hyopneumoniae* seropositivity in an SPF breeding herd. Porc Heal Manag 4, 12.

Vangroenweghe, F., Willems, E., Thas, O., Maes, D., 2018b. Confirmation of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a breeding herd through tracheobronchial swab sampling and PCR. Vet Rec 183, 325.

Vilalta, C., Baker, J., Sanhueza, J., Murray, D., Sponheim, A., Alvarez, J., Sylvia, F., Polson, D., Torremorell, M., Corzo, C., Morrison, R.B., 2019. Effect of litter aggregation and pooling on detection of porcine reproductive and respiratory virus in piglet processing fluids. J Vet Diagnostic Investig 31, 625-628.

Villarreal, I., Vranckx, K., Duchateau, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Jensen, J.C., Nanjiani, I.A., Maes, D., 2010. Early *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in European suckling pigs in herds with respiratory problems: detection rate and risk factors. Vet Med (Praha) 55, 318-324.



## **Capítulo 3**

**Respuesta de fase aguda en suero  
inducida por diferentes protocolos de  
vacunación contra PCV-2 y Mhyo en  
lechones**



### RESUMEN

El propósito de este estudio fue comparar la RFA inducida por diferentes protocolos de vacunación utilizados contra PCV-2 y Mhyo, estudiando dos PFA y cambios en la TR. Además, se analizó la posible influencia del tiempo de vacunación y la raza. En el primer experimento, 40 lechones cruzados comerciales fueron vacunados el día del destete con FLEXcombo® (grupo A, n = 20) o Porcilis PCV® y Stellamune® One (grupo B, n = 20). El segundo experimento se realizó en dos granjas, en las que se vacunaron 40 lechones cruzados comerciales o 40 lechones ibéricos, 7 días después del destete. En cada granja, un grupo (A, n = 20) fue vacunado con FLEXcombo® y otro grupo (B, n = 20) con Porcilis® PCV-Mhyo. Se tomaron muestras de sangre antes de la vacunación, y 24 h y 48 h después de la vacunación. Además, se registró la TR antes y 8 h después de la vacunación. Se registraron mayores incrementos en la TR ( $p < 0.01$ ) y en las concentraciones de PFA ( $p < 0.01$ ) en varios momentos de muestreo después de la vacunación en el grupo B que en el grupo A. Las vacunas que produjeron mayores incrementos en la TR también produjeron mayores incrementos de PFA, sin ser éstos influenciados por del día de la vacunación o de la raza del cerdo. Por lo tanto, las concentraciones séricas de PFA difieren según la vacuna utilizada, lo que puede ser útil, junto con la TR, para elegir la vacuna o el protocolo que produce una RFA de menor magnitud.





### 1. INTRODUCCIÓN

El Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) es el principal agente etiológico que provoca diferentes enfermedades y síndromes, incluyendo el PMWS y el PRDC. La infección con PCV-2 y Mhyo desempeña un papel principal en el PRDC y continúa teniendo un gran impacto económico en la industria porcina en todo el mundo (Kim et al., 2003).

El control de PRDC se basa en estrategias de manejo, control de infecciones y vacunación. Las vacunas comerciales de PCV-2 y Mhyo se usan ampliamente en la producción porcina en todo el mundo, y se han observado efectos positivos en la salud animal, al menos en rebaños con un estado de salud subóptimo (Herbich et al., 2013). Los lechones están en contacto con virus y bacterias en diferentes etapas, y es una práctica común administrar las vacunas al menos de 2 a 4 semanas antes de la exposición (Opriessnig et al., 2009). La vacunación demasiado tarde podría coincidir con la presencia de cepas de PCV-2 de campo pudiendo ser menos exitosa (Wagner, 2007).

Se ha demostrado que la vacunación causa diferentes grados de RFA, que se puede evaluar midiendo las proteínas presentes en esta fase (PFA) (Eckersall et al., 2008). Las PFA se han propuesto como biomarcadores adecuados para controlar la respuesta inflamatoria (Heegaard et al., 2011) y el bienestar en general (Murata, 2007), lo que las convierte en parámetros ideales para la evaluación global del bienestar de los cerdos (Eckersall & Bell, 2010). Además, en la especie ovina, se ha postulado que la monitorización de la respuesta inmediata posterior a la vacunación también podría brindar una información valiosa y temprana sobre la eficacia de las vacunas (Eckersall et al., 2008). En un estudio reciente, Destexhe y colaboradores en (Destexhe et al., 2013), propusieron el uso de la CRP como un biomarcador potencial de vacunas para conejos en estudios de seguridad no clínicos. Por lo tanto, las PFA podrían usarse como biomarcadores para seleccionar el protocolo de vacunación que produce una menor

reacción inflamatoria en el individuo. Sin embargo, según nuestro conocimiento, no existen estudios comparativos en condiciones de campo sobre la respuesta de estos biomarcadores después de diferentes protocolos de vacunación en lechones, o sobre cómo factores como el día de la vacunación o la raza pueden influir en la respuesta inflamatoria producida por la vacunación.

El propósito del presente estudio fue comparar la RFA inducida aplicando diferentes protocolos de vacunación contra PCV-2 y Mhyo analizando en sangre dos PFAs positivas (Hp y CRP) y los cambios en la TR. Además, se estudió la influencia del momento de la vacunación (el día del destete y posteriormente al destete) y la raza (cruces comerciales y lechones ibéricos).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Diseño experimental**

#### 2.1.1. Experimento 1

Se utilizaron cuarenta lechones cruzados *Pietrain x Landrace-Large White* de una granja ubicada en el sureste de España. Durante el estudio, un lote de lechones se dividió en dos grupos de 20 animales seleccionados al azar (10 hembras y 10 machos), que fueron vacunados el día del destete (25 días de edad). El grupo A se vacunó con 1 ml de CircoFLEX® y con 1 ml de MycoFLEX® en una sola inyección de 2 ml (FLEXcombo®; Boehringer Ingelheim GmbH Vetmedica Inc. Alemania). El grupo B se vacunó con Porcilis PCV® (Intervet International BV, Países Bajos) y Stellamune® One (Elanco Valquímica, S.A., España) en dos inyecciones de 2 ml cada una.

### 2.1.2. Experimento 2

#### *2.1.2.1. Experimento 2.1.*

El estudio se realizó en una granja de 1000 cerdas ubicada en el sureste de España. En este caso, se vacunaron dos grupos de 20 lechones cruzados *Pietrain x Landrace-Large White* 7 días después del destete (a los 31 días de vida) con 1 ml de CircoFLEX® y con 1 ml de MycoFLEX® en una sola inyección de 2 ml de FLEXcombo® (Boehringer IngelheimGmbHVetmedica Inc. Alemania) (Grupo A) o con una sola inyección de 2 ml de Porcilis® PCVM. hyo (Intervet International BV, Países Bajos) (Grupo B). Los animales fueron seleccionados al azar y se identificaron con doble crotal.

#### *2.1.2.2. Experimento 2.2.*

Este estudio se repitió siguiendo el mismo protocolo que el anterior (Experimento 2.1) en una granja de 1000 cerdas ubicada en el suroeste de España, utilizando lechones ibéricos.

### **2.2. Muestreo de sangre, TR y peso**

En todos los experimentos y grupos (A y B) del estudio se tomaron muestras de sangre antes de la vacunación (día 0 o nivel basal), 24 h después de la vacunación (24 h Post-V) y 48 h después de la vacunación (48 h Post-V). Los sueros se almacenaron a -80 °C hasta la realización de los análisis de la Hp y la CRP.

Asimismo, la TR se midió en todos los animales del estudio con un termómetro digital antes de la vacunación (nivel basal) y 8 h después de la vacunación (8 h Post-V).

Adicionalmente, en los experimentos 2.1 y 2.2 los animales se pesaron individualmente, usando una báscula (PCE-PB 60 N; PCE Ibérica SL, Albacete, España), en el día 0, día 1 (24 h Post-V), día 2 (48 h Post-V) y 39 días después de la vacunación.

La evaluación de las reacciones sistémicas en los lechones provocadas por la vacunación se observó todos los días durante el período experimental.

Este estudio de campo se realizó de acuerdo con el principio de "*Buenas Prácticas Clínicas*" (GCP) y, el protocolo experimental se realizó de acuerdo con las Directivas del Consejo Europeo respecto a la protección de los animales utilizados con fines experimentales.

### **2.3. Vacunas**

Para los experimentos llevados a cabo en este estudio, se utilizaron diferentes vacunas comerciales:

- Ingelvac CircoFLEX®: vacuna inactivada que contiene la proteína de la cápside ORF2 purificada de PCV-2 como antígeno y un polímero acuoso (carbómero) como adyuvante (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Alemania).
- Ingelvac MycoFLEX®: contiene Mhyo inactivado (cepa J, aislado B-3745) y tiene un adyuvante de carbómero (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Alemania). Esta vacuna se puede mezclar con Ingelvac CircoFLEX® para la inoculación en un único punto de inyección. Esta combinación se conoce como FLEXcombo® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Alemania).
- Porcilis PCV®: contiene la proteína de la cápside ORF2 de PCV-2 como antígeno y  $\alpha$ -tocoferol + parafina líquida como adyuvante (Intervet International BV, Países Bajos).
- Stellamune® One: contiene Mhyo inactivo (cepa NL1042). Como coadyuvantes contiene aceite mineral, una parafina líquida y lecitina de soja (Elanco Valquímica, S.A., España).

- Porcilis®PCV-Mhyo: contiene la proteína de la cápside ORF2 de PCV-2 y Mhyo inactivo (cepa J). Como coadyuvantes contiene aceite mineral y aluminio (como hidróxido) (Intervet International BV, Países Bajos).

Las vacunaciones se realizaron por vía intramuscular a todos los cerdos. Todas las vacunas se atemperaron antes de la inoculación y se usaron de acuerdo con las características del producto.

#### **2.4. Determinación de la haptoglobina (Hp) y la proteína C reactiva (CRP)**

Los niveles de Hp y CRP se midieron en suero utilizando un analizador de bioquímica automatizado (Olympus AU600 Automatic Chemistry Analyzer, Olympus Europe GmbH, Hamburgo, Alemania) con reactivos comerciales de SPINREACT, SAU (Girona, España) y Beckman Coulter® (CA, EE. UU.), respectivamente. Los ensayos mostraron un coeficiente de variación < 10% en el intra- e inter-análisis, los cuales fueron lineales con muestras diluidas en serie, siendo los límites de detección 0.01 mg/ml para Hp y 0.6 µg/ml para CRP.

#### **2.5. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando un paquete estadístico comercial (GraphPad Prism 6, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Se realizó una prueba de normalidad de distribución de los datos para los diferentes parámetros usando la prueba de Shapiro-Wilk. Excepto la TR, ninguno de los parámetros cumplió con los criterios de distribución normal, por lo que se realizó una transformación logarítmica para todos ellos. Los datos se presentan como medias ± error estándar (EEM). Se realizó una comparación entre grupos (A y B) mediante un ANOVA para medidas repetidas aplicando una comparación múltiple mediante la prueba post-hoc de Bonferroni. El modelo incluyó el tipo de vacuna (A y B), el día de muestreo y su interacción como efectos principales. Para

la comparación intra grupal (grupos A y B, independientemente), se usaron los valores de cada parámetro en el día 0 como valores basales. Un valor de  $p < 0.05$  indica significación estadística en todos los análisis.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Temperatura rectal (TR)**

##### 3.1.1. Experimento 1

La interacción entre el tipo de vacuna y el día de muestreo fue significativa en la TR en lechones comerciales cruzados vacunados el día del destete (25 días de edad) ( $p < 0.01$ ). A las 8 h Post-V, los lechones del grupo B mostraron evidencia de pirexia ( $40.6 \pm 0.10$  °C), en comparación con los valores basales ( $39.9 \pm 0.08$  °C) ( $p < 0.001$ ), mientras que en el grupo A el aumento no fue significativo (de  $39.6 \pm 0.09$  °C a  $39.7 \pm 0.05$  °C). Además, los niveles de TR en el grupo B ( $40.6 \pm 0.10$  °C) fueron significativamente más altos que en el grupo A ( $39.7 \pm 0.05$  °C) 8 h Post-V ( $p < 0.001$ ).

##### 3.1.2. Experimento 2

###### *3.1.2.1. Experimento 2.1.*

La interacción entre el tipo de vacunación y el día del muestreo fue significativa para la TR en los lechones comerciales cruzados vacunados siete días después del destete (edad 31 días) ( $p < 0.01$ ). En comparación con los valores basales, a las 8 h Post-V se observó un aumento significativo en el grupo B (de  $39.5 \pm 0.09$  °C a  $40.9 \pm 0.08$  °C;  $p < 0.001$ ) pero no en el grupo A (de  $39.5 \pm 0.10$  °C a  $39.9 \pm 0.09$  °C). La TR fue significativamente mayor en animales del grupo B ( $40.9 \pm 0.08$  °C) comparado con los del grupo A ( $39.9 \pm 0.09$  °C) ( $p < 0.01$ ).

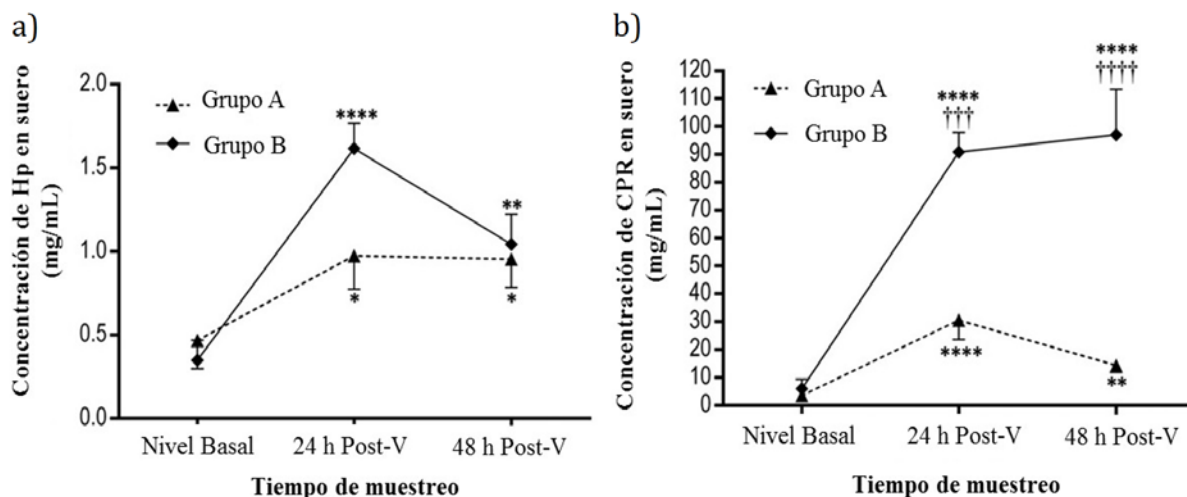
### *3.1.2.2. Experimento 2.2.*

En los lechones ibéricos vacunados siete días después del destete (edad 31 días), la interacción entre el tipo de vacuna y el día de muestreo fue significativa para la TR ( $p < 0.01$ ). En comparación con los valores de referencia, a las 8 h Post-V el grupo B mostró un aumento significativo de la temperatura (de  $39.5 \pm 0.07$  a  $41.0 \pm 0.06$  °C;  $p < 0.001$ ), mientras que en el grupo A el aumento no fue significativo ( $39.6 \pm 0.09$  °C a  $39.9 \pm 0.07$  °C). Además, las TR en el grupo B fueron significativamente más altas que en el grupo A ( $p < 0.01$ ).

## **3.2. Haptoglobina (Hp) y proteína C reactiva (CRP)**

### 3.2.1. Experimento 1

En los lechones comerciales cruzados vacunados al destete (25 días de edad), la interacción entre el tipo de vacunación y el día de muestreo fue significativa tanto para la Hp ( $p < 0.05$ ) como para la CRP en suero ( $p < 0.01$ ). En el caso de Hp, no hubo diferencias significativas entre los grupos A y B en ningún momento (Figura 1a). Sin embargo, las concentraciones de CRP en lechones fueron significativamente más altas en el grupo B que en el grupo A, tanto 24 h Post-V ( $p < 0.001$ ) como 48 h Post-V ( $p < 0.0001$ ) (Figura 1b). Se observaron aumentos significativos en las concentraciones de Hp y CRP sobre los valores de referencia en todos los tiempos de muestreo en ambos grupos ( $p < 0.05$ ).



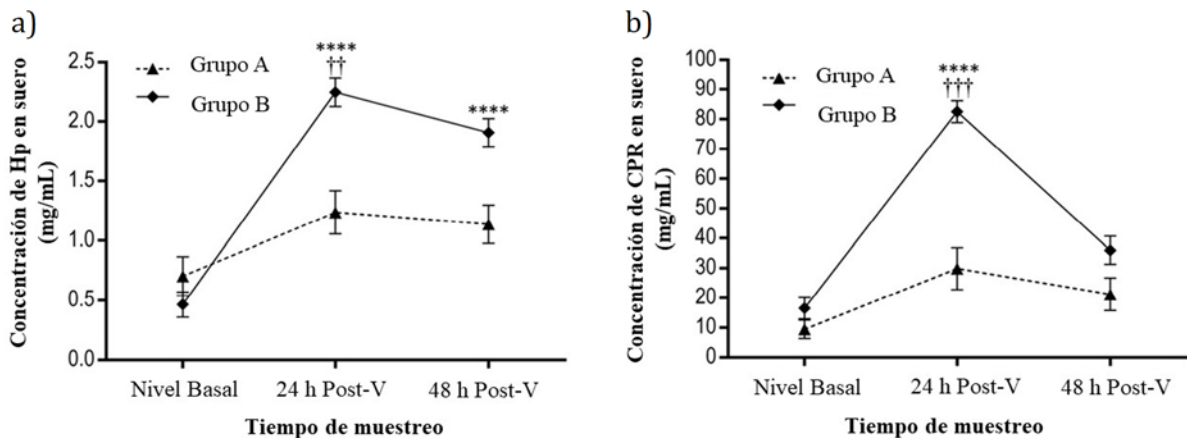
**Figura 1.** Concentraciones séricas de Hp (a) y CRP (b) en 40 lechones (20 del grupo A y 20 del grupo B) *Pietrain x Landrace-Large White* vacunados el día del destete y muestreados antes de la vacunación (nivel basal), 24 h después de la vacunación (24 h Post-V) y 48 h después de la vacunación (48 h Post-V). El grupo A fue vacunado con FLEXcombo® mientras que el grupo B con Porcilis®PCV y Stellamune® One. Los valores mostrados son medias  $\pm$  EEM. Los símbolos \*\*\*\*, \*\* y \* indican diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente) en cada grupo con respecto al nivel basal. Los símbolos †††† y ††† indican diferencias significativas ( $p < 0.0001$  y  $p < 0.001$ , respectivamente) entre los grupos A y B de lechones a lo largo del tiempo.

### 3.2.2. Experimento 2

#### 3.2.2.1. Experimento 2.1.

En los lechones comerciales cruzados vacunados a los siete días después del parto (31 días de edad), la interacción entre el tipo de vacunación y el día de muestreo fue significativa para la Hp y la CRP en suero ( $p < 0.01$ ). Se observaron diferencias significativas en los niveles de Hp ( $p < 0.01$ ) y CRP ( $p < 0.001$ ) entre los lechones de los grupos A y B a las 24 h Post-V (Figura 2a y 2b). Se observó un incremento significativo en la concentración de Hp y CRP sobre los valores de referencia en el grupo B a las 24 h Post-V, mientras que a las 48 h Post-V solo incrementó significativamente la concentración de Hp ( $p < 0.0001$ ). En el grupo A, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de Hp y CRP y los valores basales en ningún momento del muestreo.

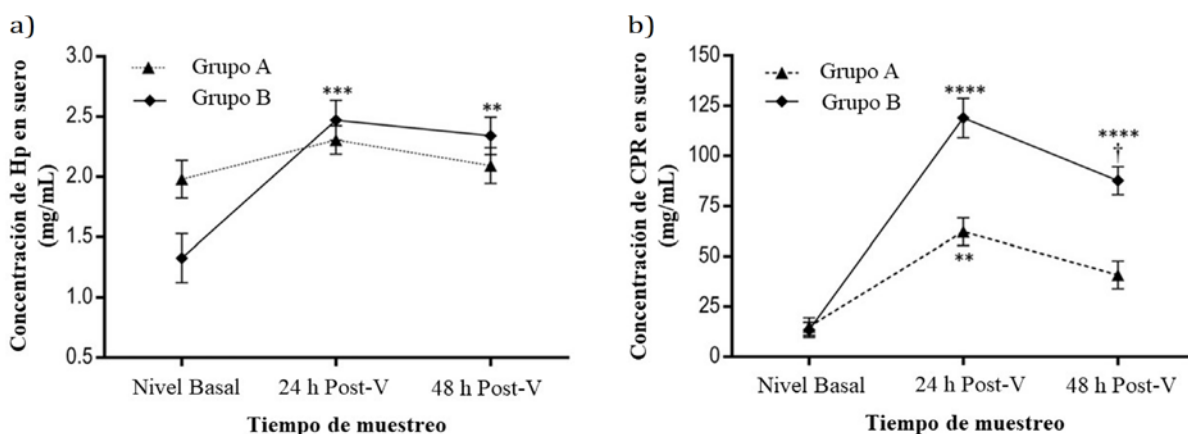




**Figura 2.** Concentraciones séricas de Hp (a) y CRP (b) en 40 lechones (20 del grupo A y 20 del grupo B) *Pietrain x Landrace-Large White* vacunados 7 días después del destete y muestreados antes de la vacunación (nivel basal), 24 h después de la vacunación (24 h Post-V) y 48 h después de la vacunación (48 h Post-V). El grupo A fue vacunado con FLEXcombo® mientras que el grupo B con Porcilis®PCV-Mhyo. Los valores mostrados son medias  $\pm$  EEM. El símbolo \*\*\*\* indica diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) en cada grupo respecto al nivel basal. Los símbolos †††:  $p < 0.001$  y ††:  $p < 0.01$  indican diferencias entre los grupos A y B de lechones a lo largo del tiempo.

### 3.2.2.2. Experimento 2.2.

En los lechones ibéricos, donde la vacunación se administró siete días después del destete (edad 31 días), la interacción entre el tipo de vacunación y el día de muestreo fue significativa en el suero tanto para Hp ( $p < 0.05$ ) como para CRP ( $p < 0.01$ ). Se observaron altos niveles basales de Hp en ambos grupos experimentales. Se encontraron diferencias significativas en el grupo B a las 24 h Post-V ( $p < 0.001$ ) y 48 h Post-V ( $p < 0.01$ ) con respecto al nivel basal (Figura 3a). Los valores de CRP a las 48 h Post-V fueron significativamente más altos en el grupo B que en el grupo A ( $p < 0.05$ ) (Figura 3b). En relación con el nivel basal, se observaron aumentos significativos en las concentraciones de CRP en el grupo B a las 24 h y 48 h Post-V ( $P < 0.0001$ ), mientras que en el grupo A, el aumento solo fue significativo para la CRP a las 24 h Post-V ( $P < 0.01$ ).



**Figura 3.** Concentraciones séricas de Hp a) y CRP b) en 40 lechones ibéricos (20 del grupo A y 20 del grupo B) vacunados 7 días después del destete y muestreados antes de la vacunación (nivel basal), 24 h después de la vacunación (24 h Post-V) y 48 h después de la vacunación (48 h Post-V). El grupo A fue vacunado con FLEXcombo® mientras que el grupo B con Porcilis®PCV-Mhyo. Los valores mostrados son medias  $\pm$  EEM. Los símbolos \*\*\*\*, \*\*\* y \*\* indican diferencias ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.001$  y  $p < 0.01$ , respectivamente) en cada grupo respecto al nivel basal. El símbolo † indica diferencias ( $p < 0.05$ ) entre los grupos A y B de lechones a lo largo del tiempo.

### 3.3. Aumento de peso diario

#### 3.3.1 Experimento 2.1

No se observaron diferencias significativas en el peso promedio entre el grupo A ( $6.53 \pm 0.29$  kg) y B ( $6.61 \pm 0.25$  kg) en el momento de la vacunación. La GMD fue significativamente mayor en los animales del grupo A en comparación con los animales del grupo B a las 24 h Post-V ( $173 \pm 35$  g frente a  $-29 \pm 17$  g;  $p < 0.0001$ ) y a las 48 h Post-V ( $193 \pm 26$  g frente a  $48 \pm 17$  g;  $p < 0.001$ ). No se observaron diferencias significativas en el aumento de peso promedio entre el grupo A ( $13.0 \pm 0.99$  kg) y el grupo B ( $11.5 \pm 0.71$  kg) a los 39 días después de la vacunación ( $p = 0.06$ ).

### 3.3.2. Experimento 2.2

No se observaron diferencias significativas en el peso promedio entre los grupos A ( $8.22 \pm 0.22$  kg) y B ( $8.23 \pm 0.23$  kg) en el momento de la vacunación. La GMD fue significativamente mayor en los animales del grupo A que en los animales del grupo B a las 24 h ( $252 \pm 38$  g vs.  $-72 \pm 38$  g;  $p < 0.0001$ ) y a las 48 h Post-V ( $360 \pm 31$  g vs.  $238 \pm 56$  g;  $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas en el aumento de peso promedio a los 39 días después de la vacunación entre el grupo A ( $13.2 \pm 0.67$  kg) y el grupo B ( $12.0 \pm 0.71$  kg) ( $p = 0.07$ ).

## **4. DISCUSIÓN**

El presente estudio evalúa en condiciones de campo la respuesta de la Hp y la CRP después de la aplicación de diferentes vacunas contra PCV-2 y Mhyo en lechones. El momento de vacunación coincide con el destete, que es uno de los eventos más estresantes en la vida de un cerdo, provocado por los abruptos cambios sociales, nutricionales y ambientales involucrados (Niekamp et al., 2007). Tal estrés puede contribuir a las disfunciones del sistema intestinal e inmune que resultan en una reducción de salud, crecimiento y consumo de alimento (Campbell et al., 2013). Por lo tanto, la vacunación no debe contribuir a comprometer el bienestar ni impedir la adaptación de los lechones a esta situación estresante, ya que cualquier reacción adversa tendrá un impacto a lo largo de la vida productiva del animal. Según la evidencia clínica, virológica, inmunológica y patológica obtenida en condiciones experimentales y de campo, todas las vacunas disponibles comercialmente en nuestro estudio son altamente efectivas contra la infección. De hecho, la vacunación se considera la estrategia más rentable para el control y la prevención de enfermedades (Chae, 2012; Simionatto et al., 2013; da Silva et al., 2014; Koinig et al., 2015). En el presente estudio, las PFA no se utilizaron como biomarcadores de la eficacia de la vacuna, sino como biomarcadores para evaluar el grado

de inflamación y bienestar asociado a la inoculación. Una vacuna que produce una menor reacción inflamatoria cuando se aplica es preferible en términos de bienestar y también porque cualquier reacción sistémica inflamatoria produce cambios metabólicos que dañan y aumentan el catabolismo proteico, reduciendo el crecimiento muscular (Ceciliani et al., 2002).

Los niveles de referencia de las PFA obtenidos de los dos experimentos (Experimento 1 y 2.1), donde se usaron en lechones comerciales cruzados, siempre fueron inferiores a los valores de referencia propios descritos por Gutiérrez et al. (2009) (0.56 mg/ml para Hp y 32.64 µg/ml para CRP) procedentes de cerdos convencionales enfermos (*Duroc × Landrace-Large White*) de edad similar en condiciones de campo. Estas concentraciones iniciales también estaban dentro de los rangos reportados por Pomorska-Mol et al. (2012) para Hp (0.4 – 0.8 mg/ml y CRP (10 - 20 µg/ml) en lechones comerciales a las 3-4 semanas de edad en condiciones de campo. Por lo tanto, las concentraciones basales de suero de la Hp y la CRP obtenidas en el presente estudio y la ausencia de cualquier signo clínico externo de enfermedad indicaron que nuestros animales estaban sanos y, por lo tanto, podían ser vacunados. Las concentraciones basales de Hp en los lechones ibéricos (1.98 y 1.35 mg/ml para los grupos A y B, respectivamente, en el Experimento 2.2) estaban por encima de los niveles de referencia descritos para los lechones convencionales (Gutiérrez et al., 2009; Pomorska-Mol et al., 2012). Sin embargo, hasta donde sabemos, no hay estudios sobre rangos de referencia para la CRP y la Hp en lechones ibéricos, por lo que es posible que esta raza muestre mayores concentraciones para la Hp. Por lo tanto, no se puede establecer si estos valores corresponden a individuos sanos o están fuera del rango de referencia para esta especie o si corresponden a una inflamación subclínica. Esto debe considerarse como una limitación de este estudio.

Las PFA son un grupo de proteínas sanguíneas que cambian su concentración en animales sujetos a desafíos externos como pueden ser una infección, una situación de estrés o una respuesta inflamatoria (Eckersall, 2010). La Hp y la CRP se denominan PFA positivas porque sus concentraciones aumentan después del desafío. En nuestros resultados la vacunación indujo una respuesta inflamatoria acompañada de un aumento de las PFA positivas ya que se observó un aumento (superior a los valores de referencia descritos anteriormente) en las concentraciones de Hp y CRP después de la vacunación sobre los niveles basales en todos los experimentos realizados, incluso con aquellas vacunas que apenas indujeron fiebre. Andersen y colaboradores (Andersen et al., 2012) mostraron que la vacunación parece ser un potente inductor de RFA en caballos, incluso en ausencia de signos clínicos sistémicos de inflamación, como la fiebre. En cualquier caso, una vacuna que induce una menor respuesta febril después de la administración genera una menor demanda energética por parte del cuerpo y, por lo tanto, da como resultado una mejor adaptación y un mejor bienestar durante el proceso de vacunación en lechones. Como reflejo de esto, en el experimento 2, los grupos que mostraron un aumento más bajo en la temperatura, permaneciendo cerca de un rango de TR normal (38.7–39.8 °C), también mostraron un mayor aumento de peso. Esto podría favorecer una mejor GMD y un mayor desarrollo de los lechones. Sin embargo, se necesitan más estudios con más animales para confirmar esta hipótesis. Se ha demostrado que un mejor arranque en el crecimiento en cerdos inmediatamente después del destete afecta al rendimiento a lo largo de las fases de engorde y finalización (Tokach et al., 1992). Además, el aumento de la ingesta de alimento durante la primera semana después del destete reduce el riesgo de desarrollar trastornos digestivos (Madec et al., 1998).

En este estudio, las mayores diferencias en la concentración de Hp y CRP dependieron del tipo de vacuna suministrada, que parece ser el factor determinante en la

magnitud de las RFAs. Las variaciones en la respuesta inflamatoria entre las vacunas pueden ser causadas por varios factores, como el volumen de inyección, el adyuvante o, en el caso de las vacunas contra Mhyo, también la cepa ya que no contenían la misma debido a las diferentes características del producto. Independientemente de la causa, las vacunas que produjeron el mayor aumento en la TR también fueron las que produjeron mayores incrementos en las concentraciones de Hp y CRP. Además, la vacunación simultánea combinada contra PCV-2 y Mhyo no pareció haber producido mayores incrementos en las concentraciones de Hp y CRP en comparación con la administración por separado. Por lo tanto, además de reducir la carga de trabajo, la vacunación simultánea podría ser beneficiosa para el bienestar animal (Herbich et al., 2013).

No hubo diferencias importantes en el incremento de las concentraciones de Hp y CRP entre los diferentes momentos de vacunación (el día del destete en el Experimento 1 y tras el destete en el Experimento 2). Con respecto al efecto de la raza (Experimento 2), el incremento de la concentración de Hp sobre los niveles de referencia en lechones ibéricos (14% y 46% en el grupo A y B, a las 24 h Post-V respectivamente) fue menor que el aumento obtenido con cerdos convencionales (43% y 79% en el grupo A y B, a las 24 h Post-V respectivamente) usando las mismas vacunas. Por contra, las concentraciones de CRP a las 24 h Post-V fueron similares para ambas razas (68% y 75% en el grupo A y 79% y 88% en el grupo B para lechones convencionales e ibéricos, respectivamente).

Los resultados de GMD y el peso final obtenidos en el grupo A del Experimento 2, indica que la mejor vacuna es la que produce el menor aumento en los niveles de Hp, CRP y TR. Se ha demostrado que el estrés del destete aumenta las concentraciones séricas de PFA (Pomorska-Mol et al., 2012), por lo que es preferible una vacuna que no contribuya a este aumento. Además, el nivel de Hp y la GMD pueden estar inversamente relacionados en el período posterior al destete (Sauerwein et al., 2005). Un estudio reciente (Fraile et

al., 2015) confirmó que la medición de Hp puede ser un indicador de GMD en granjas porcinas. Además, otros autores (Destexhe et al., 2013) postularon que el CRP podría actuar como un biomarcador para su uso en estudios de seguridad de vacunas. Por lo tanto, un mayor aumento de las PFAs podría contribuir a comprometer el bienestar de los cerdos y dificultar su adaptación a esta situación. Idealmente, desde el punto de vista del bienestar animal, una vacuna que induzca un menor nivel de inflamación sería beneficiosa siempre que su efectividad fuera aceptable. Se podría pensar que una respuesta inflamatoria aumentada provocaría una respuesta inmune más fuerte y, por lo tanto, posiblemente, una protección mejor o más duradera. Sin embargo, una mejor respuesta inmune después de la vacunación no implica necesariamente un mayor aumento de las PFA como se ha visto en la especie canina (Chew et al., 2011). Se necesita más investigación para evaluar si existe una relación entre la RFA y el nivel de protección. En términos generales, se debe tener en cuenta un nivel bajo de inflamación y un alto grado de efectividad al elegir una vacuna.

Por otro lado, aunque no se muestran los datos en este estudio, no hubo correlación en los incrementos observados de las concentraciones postvacunación de Hp y CRP entre ellas. Esto indicaría que los mecanismos de respuesta de estos biomarcadores varían con cada PFA individual, tal como se ha informado anteriormente por Eckersall y colaboradores (Eckersall et al., 2008) para la Hp y SAA después de la vacunación en ovinos. Además, se observaron diferencias en RFA entre animales del grupo vacunado con la misma vacuna. Esto también debería estudiarse en futuras investigaciones, ya que esta respuesta puede usarse para identificar lechones con una RFA alta controlada genéticamente, lo que podría aportar información útil en términos de selección genética.

Los resultados actuales indican que la magnitud de la respuesta inflamatoria de los lechones medida por la CRP y la Hp después de la vacunación dependió de la vacuna

## Capítulo 3

---

utilizada. Por lo tanto, la concentración de estas PFAs puede ser útil, junto con otros parámetros clínicos, como la TR, para elegir la vacuna o el protocolo que produzca un menor estrés y, por tanto, favorecer el bienestar y adaptación del lechón tras el destete.



### 5. REFERENCIAS

- Andersen, S.A., Petersen, H.H., Ersbøll, A.K., Falk-Rønne, J., Jacobsen, S., 2012. Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses. *Vet J* 191, 199–202.
- Campbell, J.M., Crenshaw, J.D., Polo, J., 2013. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol* 30, 4–19.
- Ceciliani, F., Giordano, A., Spagnolo, V., 2002. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein Pept Lett* 9, 211–223.
- Chae, C., 2012. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *Vet J* 194, 151–157.
- Chew, B.P., Mathison, B.D., Hayek, M.G., Massimino, S., Reinhart, G.A., Park, J.S., 2011. Dietary astaxanthin enhances immune response in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 140, 199–206.
- Da Silva, N., Carriquiry, A., O'Neill, K., Opriessnig, T., O'Connor, A.M., 2014. Mixed treatment comparison meta-analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines used in piglets. *Prev Vet Med* 117, 413–424.
- Destexhe, E., Prinsen, M.K., van Schöll, I., Kuper, C.F., Garçon, N., Veenstra, S., Segal, L., 2013. Evaluation of C-reactive protein as an inflammatory biomarker in rabbits for vaccine nonclinical safety studies. *J. Pharmacol. Toxicol Methods* 68, 367–373.
- Eckersall, P.D., Bell, R., 2010. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* 168, 28–40.
- Eckersall, P.D., Lawson, F.P., Kyle, C.E., Waterston, M., Bence, L., Stear, M.J., Rhind, S.M., 2008. Maternal undernutrition and the ovine acute phase response to vaccination. *BMC Vet Res* 15, 1.

- Fraile, L., Saco, Y., Grau-Roma, L., Nofrarías, M., López-Soria, S., Sibila, M., Callén, A., Bassols, A., Segalés, J., 2015. Serumhaptoglobin dynamics in pigs vaccinated or not vaccinated against porcine circovirus type 2. *Porc Heal Manag* 1, 3.
- Gutiérrez, A.M., Martínez-Subiela, S., Soler, L., Pallarés, F.J., Cerón, J.J., 2009. Use of saliva for haptoglobin and C-reactive protein quantifications in porcine respiratory and reproductive syndrome affected pigs in field conditions. *Vet Immunol Immunopathol* 132, 218–223.
- Heegaard, P.M., Stockmarr, A., Piñeiro, M., Carpintero, R., Lampreave, F., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J., Gruys, E., Sorensen, N.S., 2011. Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs. *Vet Res* 17, 42–50.
- Herbich, E., Heissenberger, B., Ladinig, A., Griessler, A., Ritzmann, M., Weissenbacher-Lang, C., Hennig-Pauka, I., 2013. Field trial on the simultaneous vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and Mhyo. “in German”. *Tierarztl. Prax Ausg G Grosstiere. Nutztiere* 41, 279–288.
- Kim, J., Chung, H.K., Chae, C., 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J* 166, 251–256.
- Koinig, H.C., Talker, S.C., Stadler, M., Ladinig, A., Graage, R., Ritzmann, M., Hennig-Pauka, I., Gerner, W., Saalmüller, A., 2015. PCV2 vaccination induces IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  co-producing T cells with a potential role in protection. *Vet Res* 3, 46–20.
- Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S., Jestin, A., 1998. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Prev Vet Med* 35, 53–72.
- Murata, H., 2007. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. *Vet J* 173, 473–474.

- Niekamp, S.R., Sutherland, M.A., Dahl, G.E., Salak-Johnson, J.L., 2007. Immune responses of piglets to weaning stress: impacts of photoperiod. *J Anim Sci* 85, 93–100.
- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Halbur, P.G., 2009. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSVPCV2- SIV clinical infection model 2–3-months post vaccination. *Vaccine* 27, 1002-7.
- Pomorska-Mol, M., Kwit, K., Markowska-Daniel, I., 2012. Major acute phase proteins in pig serum from birth to slaughter. *Bull Vet Inst Pulawy* 56, 553–557.
- Sauerwein, H., Schmitz, S., Hiss, S., 2005. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. *Redox Rep* 10, 295–302.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Maes, D., Dellagostin, O.A., 2013. *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. *Vet Microbiol* 165, 234–242.
- Tokach, M.D., Goodband, R.D., Nelssen, J.L., Kats, L.J., 1992. Influence of weaning weight and growth during the first week postweaning on subsequent pig performance. Report of Progress 667. Kansas Agricultural Experiment Station Research Report <http://krex.k-state.edu/dspace/bitstream/handle/2097/2556/Swine92pg15-17.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Wagner, M., 2007. Porcine circovirus associated disease: a practitioner's perspective on clinical observations and control with vaccination. *Proceedings of the Annual Swine Disease Conf for Swine Practitioners* 15, 56–59.



## **6. DISCUSIÓN GENERAL**



Los conocimientos en medicina veterinaria evolucionan como lo hacen en otras ciencias de la salud, merced al desarrollo tecnológico que permite descubrir nuevos campos de investigación hasta entonces desconocidos. En medicina porcina este hecho es, por diferentes motivos, más relevante si cabe. En primer lugar, porque el sector porcino es un sector ganadero importante para la economía y el desarrollo social de muchos países del mundo en general y de España en particular (Informe SICE, febrero 2020). En segundo lugar, porque la prevención de las enfermedades y por ende la reducción del consumo de antibióticos, pasa por un uso cada vez mayor de la vacunación como estrategia de profilaxis (informe de la AEMPS). Esto se constata cuando se comprueba la elevada inversión de recursos en investigación y el elevado número de trabajos científicos publicados sobre la epidemiología de las enfermedades más prevalentes y graves como son el PRRS, la Circovirus porcina y la NEP. Estas investigaciones conducen a adoptar estrategias basadas en ese mayor conocimiento epidemiológico de los patógenos. En tercer lugar, no se entiende una producción porcina del presente y del futuro sin bienestar animal que en gran medida pasa por utilizar vacunas de última tecnología, que tengan el menor efecto adverso sobre los animales, preservando una máxima eficacia ante la infección y mejorando por tanto la salud general de la población, en definitiva, su bienestar.

Con el objeto de aportar mayores conocimientos científicos a la profesión veterinaria sobre los aspectos mencionados anteriormente, se han desarrollado los tres capítulos de esta tesis Doctoral. En ellos hemos demostrado que mediante el estudio integral de la eficacia y la seguridad de las vacunas de PCV-2 y Mhyo, unido a la correcta adaptación a Mhyo de las futuras reproductoras, se pueden obtener mejoras en los parámetros productivos y de bienestar del ganado porcino.

La interferencia con AOM de las vacunas en general, y de PCV-2 en particular, y su relación con la eficacia en porcino es un tema en continuo debate. No comprometer la eficacia de la vacunación implica utilizar productos que, entre otras cosas, no tengan interferencia con los AOM que puedan presentar los lechones en el momento de la vacunación. El primer capítulo de esta tesis plantea el mayor estudio abordando este aspecto realizado hasta la fecha. En él se incluyeron 6112 lechones a los que se les midió los AOM en el momento de la vacunación. Para ello se establecieron dos grupos experimentales, animales vacunados con la vacuna Ingelvac CircoFLEX®, y por otro lado animales no vacunados. Se estudió la eficacia en términos de parámetros productivos y viremia en condiciones de infección de campo frente a PCV-2. Los resultados en los animales vacunados mostraron una reducción de 3.3 veces la carga vírica en sangre medida como ABC, con una correlación significativamente negativa de la viremia sobre la GMD solo en la población no vacunada. Asimismo, la mortalidad también se redujo significativamente en un 36% en el grupo de los animales vacunados. Con respecto a la GMD, nuestro análisis obtuvo diferencias significativas de 30 g en favor de los animales vacunados e incluso en los lechones con títulos extremadamente elevados hubo 10 g más de GMD comparado con los no vacunados. Existen diferentes estudios realizados siendo el más reciente el de Feng y colaboradores en 2016 (Feng et al., 2016), donde las diferencias observadas entre vacunados y no vacunados fueron de 17 g, es decir un 43.3% menos de lo que se obtuvo en nuestro estudio. Esta diferencia podría deberse al diseño específico de cada estudio. Estos autores realizaron el análisis en animales de una sola granja donde la infección natural se detectó a partir de las 18 semanas de vida. Por el contrario, nuestro estudio engloba datos de 4 granjas con situaciones epidemiológicas distintas, pero en promedio la infección natural fue más temprana situándose en torno a las 10 semanas de vida. Este hecho tiene influencia sobre los resultados de GMD habida



cuenta que, cuando un desafío acontece más tempranamente, se observan mayores diferencias entre grupos de animales vacunados y no vacunados. Esto se explica porque los animales no vacunados sufren la enfermedad durante más tiempo y el crecimiento es mucho menor que los animales vacunados, diferencias que se ven reflejadas en el valor de este parámetro. Por tanto, esta es una de las limitaciones que tienen los estudios de campo como el nuestro dónde, a diferencia de los desafíos experimentales, la infección ocurre de forma natural progresiva e impredecible. Otra diferencia reseñable con el estudio de Feng y colaboradores es que, en nuestro análisis, dentro del grupo de los animales vacunados, los de títulos altos y muy altos sí que mostraron mayores crecimientos (20 y 10 g, respectivamente) comparados con los de títulos bajos reforzando así la ausencia de interferencia de los AOM con el antígeno de la vacuna. Por el contrario, nuestros resultados coinciden con los de Feng y colaboradores respecto de la diferencia observada en el grupo de lechones no vacunados. En este caso, los animales con títulos altos crecieron significativamente más que aquellos con títulos bajos, lo que refleja un efecto evidente de protección superior de la inmunidad transferida por la madre. Estos datos concuerdan con aquellos obtenidos por otros autores en condiciones experimentales, donde la vacunación de cerdas y lechones reduce significativamente la viremia y la carga viral en los tejidos linfoides de los lechones (Opriessnig et al., 2010; O'Neill et al., 2012; Oh et al., 2014). Además, los datos de dos estudios de campo (Pejsak et al., 2010; Fraile et al., 2012) mostraron que esta estrategia de inmunización también podría dar como resultado una GMD más alta que la vacunación única de cerdas o lechones. En definitiva, la implicación práctica para los veterinarios de campo que tiene el estudio del Capítulo 1 de esta tesis, es que la vacunación de lechones con Ingelvac CircoFLEX® con independencia de los AOM es eficaz. Además, la vacunación conjunta de poblaciones de cerdas y sus lechones se podría efectuar con este producto. En la situación actual, en la

que la epidemiología de esta enfermedad ha cambiado merced al uso generalizado de la vacunación en los lechones, la prevención de la circulación del virus en la población de las madres tiene una relevancia primordial. La vacunación de madres puede ser de gran utilidad en granjas inestables donde la presión de PCV-2 es muy elevada y el virus circula activamente, pero también en las formas subclínicas de la enfermedad donde existe una oportunidad de mejora de los parámetros productivos (Young et al., 2011). En este caso, uno de los objetivos de la vacunación de las reproductoras es reducir la infección de los lechones en el útero (Figueras et al., 2018), para obtener animales no infectados ni al nacimiento ni al destete para poder vacunarlos antes de la infección natural y con una vacuna que no interfiera con los AOM.

Otro de los grandes debates del sector porcino industrializado es el control efectivo de la NEP, este a grandes rasgos lo podemos centrar en una combinación de dos factores principalmente. Por un lado, la generación de una inmunidad activa mediante vacunación de los lechones y por otro lado desarrollar estrategias para conseguir esta vacunación en animales todavía no infectados. Si bien el primer objetivo puede ser relativamente accesible con la disponibilidad en el mercado de diversas vacunas, la consecución del segundo objetivo no parece tan sencilla y además es especialmente importante en esta enfermedad para obtener la máxima eficacia vacunal (Fano et al., 2007). Se ha propuesto en la bibliografía que la exposición de las futuras reproductoras a Mhyo podría ser una estrategia para reducir la colonización de los lechones al destete, momento en el que se suelen vacunar (Pieters & Fano 2016). Por esta razón se pensó realizar el experimento detallado en el Capítulo 2, donde se estudió la eficacia del uso de la Neb para exponer las cerdas nulíparas a Mhyo. Para ello se utilizaron un total 1801 hembras nulíparas las cuales se expusieron a homogeneizados de pulmón que contenían la bacteria. Esta exposición se realizó en dos grupos de animales, por un lado, un grupo de animales se

expusieron por vía IT y, por otro lado, mediante Neb. Los resultados de los TBS obtenidos por ambas vías fueron todos positivos a PCR de Mhyo al día 14 después de la exposición. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de muestras positivas ni en la carga bacteriana entre IT o Neb. Estos resultados indican por lo tanto que la adaptación de las hembras nulíparas a Mhyo por medio de esta técnica puede ser de gran utilidad por su rapidez de implementación y homogeneidad de los resultados obtenidos. Esta metodología no presenta los inconvenientes que supone la exposición natural sugerida por otros autores (Roos et al., 2016). La exposición natural por contacto directo requiere de un espacio adicional en las instalaciones de cría de reproductoras para poner en contacto estos animales excretores con los animales a infectar. Este espacio es difícil de obtener en la mayoría de las granjas. Según los resultados de Roos y colaboradores, se necesitaría poner en contacto 6 animales excretores con 4 susceptibles para obtener un 100% de exposición al cabo de un mes. Además, sería necesario muestrear todos los animales designados como infectantes para verificar que solo excretan la bacteria y no otros patógenos como por ejemplo el virus de PRRS que supondría un problema sanitario para la granja. Sin embargo, y a pesar de las ventajas que hemos descrito anteriormente, el uso generalizado de esta técnica de exposición mediante Neb, presenta limitaciones de distinta índole. Por un lado, se debería controlar el riesgo de diseminación de otros patógenos dentro de la misma granja, pero también a otras explotaciones cercanas. Tal como se realizó en nuestro estudio, esto se conseguiría en gran medida mediante la realización de un análisis completo del homogeneizado pulmonar para detectar la presencia de otros posibles patógenos. Por esta razón, sería imperativo analizar todos y cada uno de los lotes de producto utilizado para la exposición. En este sentido, una manera de eliminar ese riesgo sería la utilización de Mhyo procedente del cultivo puro en laboratorio, si se consiguiesen desarrollar buenas

técnicas de replicación bacteriana de este microorganismo de lento e inconsistente crecimiento en los medios actuales (Cook et al., 2016). No obstante, esta posibilidad nos lleva a reflexionar sobre otra de las limitaciones, como son las de carácter legal. Si bien en EE.UU. la legislación permite el uso de patógenos de campo para la inmunización de animales afectados por una enfermedad siempre y cuando sean aplicados dentro la misma granja, en la UE la legislación es más restrictiva en este aspecto [Reglamento (UE) 2019/6]. Por ello, esta práctica debería ampararse en el marco legal de las autovacunas. Según esta legislación la bacteria debería ser atenuada, pero conservar su capacidad de adhesión a los cilios del aparato mucociliar de las vías respiratorias para generar el efecto perseguido por esta técnica de Neb. Ésta sería una posible línea de investigación para el desarrollo de nuevos productos biológicos utilizando esta vía de aplicación.

Llegados a este punto en el que hemos analizado la eficacia de una vacuna frente a PCV-2 en presencia de AOM y una tecnología para adaptar las nulíparas a Mhyo para favorecer una mayor eficacia de las vacunas de micoplasma aplicadas al lechón, es relevante hablar de la seguridad de estos productos sobre los animales. En el contexto actual, la sociedad no solo demanda calidad de carne, sino que los productos aplicados (entre los que se incluyen las vacunas) y los alojamientos, proporcionen el mayor bienestar animal posible ya se trate de cerdas nulíparas, cerdas gestantes, lactantes o lechones. En el capítulo 3 de esta tesis, se propone un novedoso protocolo basado en la medición de PFA (Hp y CRP) para conocer el efecto adverso de las vacunas sobre el bienestar de los lechones tras su vacunación en el momento del destete. En concreto se midieron las concentraciones de estos marcadores sanguíneos en lechones a las 24 h y 48 h después de ser vacunados con diferentes programas vacunales. Los resultados obtenidos revelaron diferencias estadísticamente significativas en los incrementos de estas PFA entre los grupos de animales vacunados en función de las diferentes vacunas

utilizadas. De esta manera se evidenció que unos programas vacunales (Porcilis® PCV + Stellamune® One y Porcilis® PCV Mhyo) producían una mayor RFA que otros (FLEXcombo®). En un estudio realizado en 2010 en cerdos de cebo también se demostró un incremento significativo de la Hp tras la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky, determinando así la utilidad de esta PFA en esta especie como marcador de reacción post-vacunal (Saco et al., 2010). Sin embargo, hasta la fecha no había ningún estudio que ofreciera esta información respecto del efecto comparado de diferentes vacunas frente a PCV-2 y Mhyo en lechones que son las más utilizadas a nivel mundial.

Cabe recordar las razones principales por las cuales se consideró interesante investigar acerca del uso de estos biomarcadores en lechones al destete. En primer lugar, porque los lechones en el momento del destete sufren un estrés importante al ser separados de su grupo, transportados y reorganizados en nuevos grupos en instalaciones nuevas y extrañas para ellos. Se ha estudiado bien que el estrés en esa fase del desarrollo del lechón tiene un impacto negativo en el crecimiento en términos de GMD y que además se correlaciona con un incremento significativo de la Hp (Sauerwein et al., 2005). El estrés generado en el momento del destete induce una disfunción de la mucosa intestinal por el incremento de la expresión de los receptores del factor liberador de corticotropina (Moeser et al., 2007). Un estudio más reciente describe un aumento de la permeabilidad de dicha mucosa intestinal por la alteración de las uniones estrechas que existen entre los enterocitos (Ferrando & Schultsz, 2016). En definitiva, las consecuencias clínicas son, como se observa con frecuencia a nivel de campo, el resultado de estas alteraciones gastrointestinales y el incremento de la susceptibilidad a padecer otras enfermedades como por ejemplo *Streptococcus suis*. Por ello, si el objetivo del cuidado de los lechones en esa fase tan crítica es el de favorecer la adaptación de los animales a su nueva situación para evitar los efectos indeseables del estrés, resulta imperativo utilizar vacunas con la

menor reacción sobre el organismo de estos animales. La relevancia es magna en el contexto actual de la reducción del uso de antibióticos con el objetivo de minimizar la aparición de resistencias bacterianas. Los antibióticos han minimizado el efecto de factores estresores merced al control que ejercen sobre patologías digestivas y sistémicas que pudieran aparecer tras los mismos. Es ciertamente interesante comprobar como en los resultados de los experimentos del Capítulo 3, los niveles de la concentración de la Hp tras la aplicación de algunas de las vacunas estudiadas concuerdan con los que otros autores hallaron en los lechones después del destete (Sauerwein et al., 2005). Se podría decir, por lo tanto, que algunas vacunas pueden generar un estrés similar al que sufren los lechones en el momento del destete. En segundo lugar, el interés de la sociedad por la mejora continua de las condiciones de bienestar de los animales sigue siendo, y será, una constante en la producción de proteína de origen animal. Por ello, las actuaciones veterinarias basan muchos de sus principios en la preservación y control de las condiciones de bienestar animal asegurando la aplicación de la legislación en dicha materia (Real Decreto 306/2020). Sin embargo, la información que nos aportan las PFA en relación con el bienestar animal es muy interesante (Broom & Johnson, 1993) desde el punto de vista, no solo de la aplicación de las normas legales, sino también de otros procedimientos veterinarios que se realizan en las granjas. Por ejemplo, la aplicación de las vacunas sobre los animales puede suponer un desafío para el bienestar de estos. Por lo tanto, utilizar vacunas con menor incremento de las PFA ayudan a garantizar un mayor grado de bienestar. Por último, es relevante el análisis de estos biomarcadores como testigos de reacciones adversas para poder ampliar el número de indicadores que se vienen utilizando hasta la fecha para medirlas como son la TR y las inflamaciones locales. De este modo tendría todo su sentido que las Autoridades Competentes (como la AEMPS) exigieran la inclusión de las PFA a los fabricantes de biológicos. Mediante la realización

de estudios similares a los que se proponen en el Capítulo 3 de esta tesis, se podría obtener de forma sencilla esta información. De este modo, se podría constituir una clasificación de los productos veterinarios en base a unos valores de referencia estandarizados. Siendo el fin último el de dotar a los veterinarios de información complementaria para tomar las mejores decisiones en cada caso.

### REFERENCIAS

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), 2019. España reduce un 7,2% el consumo de antibióticos en salud humana y un 32,4% las ventas de antibióticos veterinarios. Recuperado el 17 de marzo de 2020 de [www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/laaemps/2019](http://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/laaemps/2019)
- Broom, D.M., Johnson, K.G., 1993. Stress and Animal Welfare. In: Animal Behaviour Series. Chapman and Hall, ISBN 0813816599, London.
- Cook, B.S., Beddow, J.G., Manso-Silvan, L., Maglennon, G.A., Rycroft, A.N., 2016. Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol 195, 158-164.
- 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.
- Feng, H., Segalés, J., Fraile, L., López-Soria, S., Sibila, M., 2016. Effect of high and low levels of maternally derived antibodies on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection dynamics and production parameters in PCV2 vaccinated pigs under field conditions. Vaccine 34, 3044–50.
- Ferrando, M.L., Schultsz, C., 2016. A hypothetical model of host-pathogen interaction of *Streptococcus suis* in the gastro-intestinal tract. Gut Microbes 7, 154-62.
- Figueras, S., Callén, A., Sala, V., Hernández I., Rodríguez, V., 2018. Case Report: Impact of PCV2 reproductive stock vaccination on detection of virus in placental umbilical cords serum (PUCS). Proceedings of the 25<sup>th</sup> IPVS Congress, 552.
- Fraile, L., Sibila, M., Nofraras, M., López-Jimenez, R., Huerta, E., Llorens, A., López-Soria, S., Pérez, D., Segalés, J., 2012. Effect of sow and piglet porcine circovirus type 2 (PCV2)



vaccination on piglet mortality, viraemia, antibody titre and production parameters.

Vet Microbiol 161, 229-234.

Informe SICE – Evolución del Comercio Exterior del Sector Porcino Español –AÑO 2019 –  
(Febrero 2020)

Moeser, A.J., Klok, C.V., Ryan, K.A., Wooten, J.G., Little, D., 2007. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292, 173-181.

Oh, Y., Seo, H.W., Park, C., Chae, C., 2014. Comparison of sow and/or piglet vaccination of 3 commercial porcine circovirus type 2 (PCV2) single-dose vaccines on pigs under experimental PCV2 challenge. Vet Microbiol 172, 371-380.

O'Neill, K.C., Hemann, M., Giménez-Lirola, L.G., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. Vaccination of sows reduces the prevalence of PCV-2 viraemia in their piglets under field conditions. Vet Rec 171, 425.

Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Ramamoorthy, S., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2010. Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. Vet Microbiol 142, 177-183.

Pejsak, Z., Podgorska, K., Truszczyński, M., Karbowski, P., Stadejek, T., 2010. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Comp Immunol Microbiol Infect Dis 33, 1-5.

Pieters, M., Fano, E., 2016. *Mycoplasma hyopneumoniae* management in gilts. Vet Rec 178, 122-123.

Real Decreto 306/2020, de 11 de febrero, por el que se establecen normas básicas de ordenación de las granjas porcinas intensivas, y se modifica la normativa básica de ordenación de las explotaciones de ganado porcino extensivo. «BOE» núm. 38, de 13 de febrero de 2020, páginas 13761 a 13791.

Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de diciembre de 2018 sobre medicamentos veterinarios y por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE. Diario Oficial de la Unión Europea L 4/43.

Saco, Y., Fraile LJ, Gimenez, M., Pato, R., Montoya, M., Bassols, A., 2010a. Haptoglobin serum concentration is a suitable biomarker to assess the efficacy of a feed additive in pigs. *Animal* 4, 1561-7.

Sauerwein, H., Schmitz, S., Hiss, S., 2005. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. *Redox Report* 10, 295-302.

Young, M.G., Cunningham, G.L., Sanford, S.E., 2011. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *J Swine Health Prod* 19, 175-80.

## **7. CONCLUSIONES**



### Capítulo 1:

1. La eficacia medida en términos ganancia media diaria, viremia de circovirus porcino 2 y mortalidad, de la vacuna utilizada (Ingelvac CircoFLEX®) aplicada a las 3 semanas de edad para controlar el circovirus porcino 2, no se ve afectada por el nivel de inmunidad maternal en el momento de la vacunación.
2. La inmunidad maternal transferida a través del calostro tiene un efecto protector contra la infección por circovirus porcino 2.

### Capítulo 2:

3. La tecnología de nebulización es un método eficaz para la exposición de animales a *Mycoplasma hyopneumoniae*.
4. La exposición mediante nebulización es igual de eficaz que la inoculación intratraqueal.
5. El muestreo de raspado traqueobronquial es una técnica innovadora y fiable para evaluar el éxito de la correcta exposición mediante nebulización.

### Capítulo 3:

6. La magnitud de la respuesta inflamatoria de los lechones medida por la proteína C reactiva y la Haptoglobina después de la vacunación depende de la vacuna utilizada.
7. El momento de vacunación no tiene influencia sobre el aumento de las concentraciones de la proteína C reactiva y la Haptoglobina.
8. El incremento de Haptoglobina sobre los niveles basales en lechones ibéricos es menor que el aumento obtenido con los cerdos convencionales utilizando las mismas vacunas.

## Conclusiones

---

9. La concentración de estas proteínas de fase aguda es muy útil, junto con otros parámetros clínicos como la temperatura rectal, para elegir la vacuna o el protocolo que produzca una menor inflamación.

## **8. ANEXO: PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**





Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

### **Artículos publicados en revista científicas indexadas internacionales:**

- Hernández-Caravaca, I., **Gourgues, S. F.**, Rodríguez, V., Estrada, E. D., Cerón, J. J., Escribano, D. 2017. Serum acute phase response induced by different vaccination protocols against circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglets. *Research in veterinary science*, 114, 69–73.
- **Figueras-Gourgues, S.**, Fraile, L., Segalés, J., Hernández-Caravaca, I., López-Úbeda, R., García-Vázquez, F.A., Gomez-Duran, O., Grosse-Liesner, B. 2019. Effect of Porcine circovirus 2 (PCV-2) maternally derived antibodies on performance and PCV-2 viremia in vaccinated piglets under field conditions. *Porcine health management*, 5, 21.
- **Figueras, S.**, Fano, E., Alegre, A., López, E., Hernández, I., García-Vázquez, F.A., Rodríguez, V., Garcia-Morante, B., 2020. Assessment of the use of nebulization technology for gilt exposure to *Mycoplasma hyopneumoniae* as an acclimation strategy. *Journal Swine Health and Production*. (*Under final review previous publication*)

### **Artículos en revistas de divulgación:**

- Hernandez-Caravaca, I., Escribano, D., **Figueras-Gourgues, S.**, Rodriguez-Vega, V., Díaz, E., Cerón, J., Escribano, D., 2017. Las proteínas de fase aguda permiten evaluar el grado de bienestar asociado a la vacunación. *Suis*. Noviembre 142, 72-6.
- **Figueras-Gourgues, S.**, Fraile, L., Segalés, J., Hernández-Caravaca, I., López-Úbeda, R., García-Vázquez, F.A., Gomez-Duran, O., Grosse-Liesner, B. 2020. Efecto de los anticuerpos de origen materno frente al circovirus porcino 2 sobre el rendimiento y la viremia de PCV-2 en lechones vacunados. *Suis*. Enero/Febrero, 164. 62-42.

**Publicaciones en congresos/jornadas internacionales:**

- **Figueras, S.**, Fraile, L., Segalés, J., Grosse, B., Hernández, I., García-Vázquez, F.A. 2019. Impact of maternally derived antibodies on average daily weight gain in piglets vaccinated against Porcine circovirus 2 (PCV-2). Proceedings of the 11<sup>th</sup> ESPHM. 280.

**Publicaciones o pósters en congresos/jornadas nacionales:**

- **Figueras, S.**, Fraile, L., Segalés, J., Hernández, I., García-Vázquez, F.A. 2018. Efecto de la inmunidad maternal sobre la ganancia media diaria en lechones vacunados frente a circovirus porcino 2 (PCV-2). IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia.
- **Figueras, S.**, Hernández, I., Escribano, D., García-Vázquez, F.A., Cerón, J. 2019. Effects of two different Circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine combinations on acute phase proteins in piglets. V Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia.