

# Estudio exploratorio sobre *Mycoplasma hyopneumoniae* en granjas porcinas del norte de la provincia de La Pampa, Argentina, utilizando PCR como metodología de diagnóstico

Publicado online 06 de abril de 2022

Murcia, V.N.<sup>1</sup>; Beneitez, A.<sup>1</sup>; Pordomingo, A.J.<sup>1</sup>; Miranda, A.<sup>1</sup>

## RESUMEN

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es el principal agente causal de la neumonía enzoótica porcina, enfermedad respiratoria ampliamente distribuida y conocida en el mundo por las pérdidas económicas que ocasiona en la producción. No existe información sobre la prevalencia de *M. hyopneumoniae* en la provincia de La Pampa, es por eso que el objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio exploratorio de campo a partir de muestras de hisopados nasales de cerdos de 20 a 50 kg PV. Se utilizó la técnica diagnóstica molecular PCR para detectar la presencia de ADN del agente etiológico. Se evaluaron 218 muestras que resultaron todas negativas. La información generada es valiosa para el sector porcino pampeano, aunque se remarca la necesidad de continuar con mayores estudios para cuantificar el impacto sanitario de dicha enfermedad en la provincia de La Pampa.

**Palabras clave:** neumonía enzoótica porcina, cerdos, PCR.

## ABSTRACT

*Mycoplasma hyopneumoniae* is the main causal agent of Swine Enzootic Pneumonia, a chronic respiratory disease that occurs worldwide and causes major economic losses to the pig industry. There is no information about the presence of the bacteria in La Pampa province. Therefore, the aim of this study was to carry out an exploratory field research, from nasal swab samples from 20 to 50 kg BW pigs. The PCR diagnostic technique was used to detect the presence of the etiological agent DNA. 218 samples were tested, all of them were negative. Although these outcomes contribute important information for the pig sector, is necessary to continue with further studies to quantify the health impact of this disease, in La Pampa province.

**Keywords:** enzootic pneumomia, pigs, PCR.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Anguil. Ruta Nacional N.º 5 km 580 (6326), Anguil, La Pampa, Argentina.  
Correo electrónico: murcia.vanina@inta.gob.ar

## INTRODUCCIÓN

*Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina (NEP) y es el principal agente involucrado en el complejo respiratorio porcino (Maes *et al.*, 2017; Thacker y Minion, 2012; Tamiozzo, *et al.*, 2009). Las infecciones de *M. hyopneumoniae* son ampliamente distribuidas y conocidas en el mundo por las pérdidas económicas debido a los costos sanitarios, disminución del crecimiento y desarrollo de la pira y alta mortalidad causada por la asociación de agentes etiológicos secundarios (Maes *et al.*, 2017; Holst *et al.*, 2015; Clark, 1999).

La transmisión del agente ocurre por contacto directo entre animales que comparten el mismo corral, como también indirectamente mediante el contacto con aerosoles ambientales contaminados hasta 9,5 km de distancia (Otake *et al.*, 2010). Los lechones al nacimiento son considerados libres de infección mientras que, su primer contacto con la bacteria ocurriría durante el periodo de la lactancia (Calsamiglia y Pijoan, 2000; Nathues *et al.*, 2013). Ibarra *et al.* (2000) reconocen que la mayor incidencia clínica y patológica de la NEP se da en el rango de edades 20 y 50 kg PV. Se supone que estos animales colonizados tempranamente son la fuente de infección para animales de mayor edad (Nathues *et al.*, 2013). El contagio de la bacteria en estas edades es de gran importancia en los sistemas de producción intensivos donde los animales se transfieren a instalaciones limpias para su terminación (Fano *et al.*, 2007). La dinámica de infección del *M. Hyopneumoniae* es muy variable y depende de varios factores tales como el sistema de producción, presión de infección, condiciones de manejo y época del año (Segalés *et al.*, 2012).

El monitoreo de la presencia de *M. hyopneumoniae* en cerdos vivos proporciona información útil sobre la dinámica de infección dentro de la pira, los factores influyentes y las estrategias de prevención y control empleadas correctamente (Fablet *et al.*, 2010). El aislamiento de la bacteria es complicado debido a las exigencias de preparación del medio y de control para lograr el desarrollo de colonias. Además, la posibilidad

de que otras especies contaminen el cultivo e impidan su crecimiento sería una restricción importante del método (Sibila, 2013). Fablet *et al.* (2010); Sibila *et al.* (2009); Thacker, (2006) han utilizado la técnica molecular PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la determinación de la presencia o no del ADN del *M. hyopneumoniae* en animales vivos.

En Argentina, estudios realizados por Tamiozzo *et al.* (2011) determinaron la presencia de varios genotipos de *M. hyopneumoniae* en diferentes granjas del país e incluso en animales de una misma granja. En la provincia de La Pampa hay un total de 145.000 cerdos de los cuales no existen registros de la existencia de la enfermedad, pero se presume su presencia por ser tan ubicua en el resto del país. El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio epidemiológico de campo para determinar la prevalencia de *M. hyopneumoniae* en granjas porcinas de la provincia de La Pampa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron al azar 20 establecimientos porcinos del norte de la provincia de La Pampa (figura 1). De acuerdo a May *et al.* (2012), fueron clasificados según la cantidad de cerdas reproductoras que integraban la actividad en criaderos semiintensivos o criaderos extensivos. Los establecimientos sumaron una existencia total de 5450 cerdos (272 cerdos/granjas). Se muestrearon aleatoriamente el 10% de los animales entre 20 y 50 kg PV de cada uno de los establecimientos, obteniendo un total de 218 muestras. Los hisopados nasales se tomaron utilizando hisopos con vástago de plástico (deltalab). Las muestras se colocaron en 3 ml de PBS. Fueron conservadas en un freezer a -70 °C hasta el momento de ser procesadas en el laboratorio molecular de la EEA del INTA Anguil.

La extracción de ADN se realizó a partir de 300 µl de muestra con un método tradicional con proteinasa k de acuerdo a lo descrito por Pulido *et al.* (2006). Se corroboró la concentración del ADN extraído utilizando un espectrofotómetro de nano volumen marca Denovix.

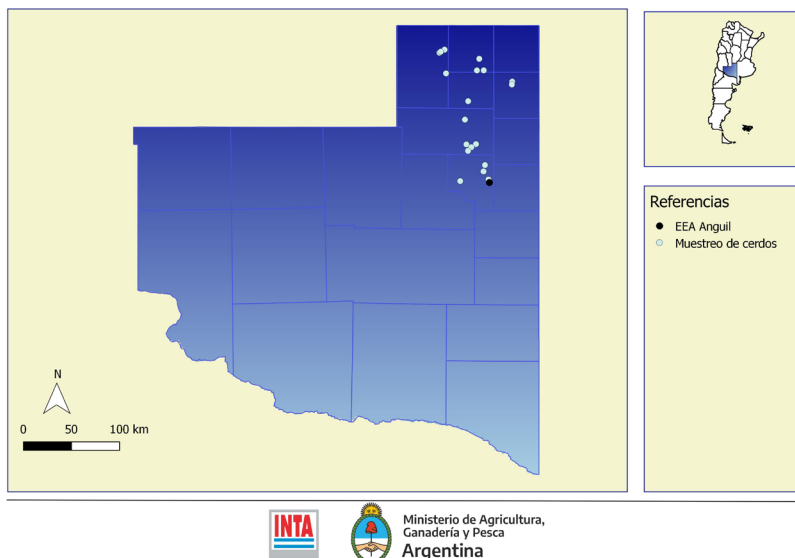


Figura 1. Localización de las granjas muestreadas en el norte de la provincia de La Pampa.

El PCR se realizó utilizando dos pares de cebadores para el gen ribosomal 16 S (16S rRNA) en el ADN del *M. hyopneumoniae*; los cebadores externos utilizados fueron los descriptos por Mattsson *et al.* (1995) y los iniciadores para la reacción interna fueron los reportados y utilizados por Calsamiglia *et al.* (1999). Las reacciones fueron llevadas a cabo de acuerdo a lo propuesto por Calsamiglia *et al.* (1999). La primera reacción amplificó un fragmento de 649 pb, y la segunda amplificó un fragmento de 352 pb (Pulido *et al.*, 2006; Ruiz y Pijoan, 2002; Calsamiglia *et al.*, 1999). El programa de ciclado fue establecido por Mattsson *et al.* (1995) y por Calsamiglia *et al.* (1999). Por último, los productos obtenidos en ambas reacciones fueron analizados por electroforesis en 1% de gel agarosa teñido con 5 µl de gel red. Se visualizó en transluminador de luz UV, Dyna Light Dual Intensity (Labnet). La siembra se realizó durante 80 min, 70 voltios. El control positivo fue donado por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El propósito de esta investigación fue generar información sobre *M. hyopneumoniae* en las granjas porcinas de la provincia de La Pampa bajo un estudio exploratorio de campo. Las muestras de hisopados nasales procesadas bajo la metodología utilizada arrojaron resultados negativos a la presencia de *M. Hyopneumoniae*.

Tamiozzo *et al.* (2011) determinaron la presencia de varios genotipos de *M. hyopneumoniae* en diferentes granjas de Argentina, e incluso en animales de una misma granja. Pero en los criaderos muestreados al azar en la provincia de La Pampa no se detectó la presencia del agente. Esta diferencia puede deberse a que Tamiozzo *et al.* (2011) muestrearon criaderos intensivos en zonas del país donde la distancia entre criaderos es inferior a 9,5 km entre sí, límite de distancia propicia para la diseminación de la enfermedad (Otake *et al.*, 2012). A diferencia de Tamiozzo *et al.* (2011) las granjas muestreadas en el presente estudio se caracterizaron por ser sistemas semiintensivos y extensivos y estaban ubicadas en un radio superior al establecido por Otake *et al.* (2012).

Los resultados preliminares de este estudio concuerdan con Pulido *et al.* (2006) que no lograron determinar la presencia de *M. hyopneumoniae* a partir de hisopados nasales de cerdos de 20 a 50 kg de PV con la técnica de PCR, y aseguraron que el resultado se debía a la baja carga bacteriana de las muestras clínicas obtenidas. Estos resultados coinciden con el reporte de Pieters *et al.* (2017) quienes han demostrado que el diagnóstico por PCR tiene baja sensibilidad en muestras de hisopados nasales en comparación con muestras de lavajes bronquio traqueales. Sin embargo, Zeeh *et al.* (2008) reportan que la detección de *M. hyopneumoniae* por PCR se caracteriza por tener alta sensibilidad y arroja resultados positivos con poca carga bacteriana en la muestra. Por un lado, Nathues *et al.* (2012) lograron determinar la presencia de la bacteria por medio de PCR en hisopados de mucosa nasales de operarios de galpones de posdestete de granjas porcinas ubicadas en el norte-oeste de Alemania. Por otro lado, Pieters *et al.* (2014) correlacionaron los animales de 5 a 8 semanas de vida positivos con el porcentaje de cerdas positivas. La prevalencia a *M. hyopneumoniae* al destete aumentó con la edad del animal en los grupos donde al menos una cerda era positiva. En el presente estudio se remarca la necesidad de reforzar las muestras tomadas como también ampliar el rango de cate-

gorías animales muestreadas. Los resultados presentados se remiten solo a la metodología utilizada.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio brindan información preliminar al sector porcino de la provincia de La Pampa sobre la prevalencia de una enfermedad de importancia mundial para la producción porcina. Si bien, este estudio abarca un número limitado de muestras, remarca la necesidad de continuar con una investigación más exhaustiva en cuanto a categorías de animales y muestras tomadas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de esta comunicación agradecen a los productores porcinos del norte de la provincia de La Pampa por su colaboración en la realización de los muestreos del estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- CALSAMIGLIA, M.; PIOJAN, C.; TRIGO, A. 1999. Application of a nested polymerase chain reaction assay to *Mycoplasma Hyopneumoniae* from nasal swabs. *Vet Diagn Invest* 11: 246-251.
- CALSAMIGLIA, M.; PIJOAN, C. 2000. Colonization state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Vet Rec* 29; 146 (18): 532-2.
- CLARK, K. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Serology/Vaccinology. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners. Annual Meeting. 1999:365-369.
- 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. *Veterinary microbiology*,143(2-4), 238-245.
- FANO, E.; PIJOAN, C.; DEE, S.; DEEN, J. 2007. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 71(3), 195.
- 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. *Journal of Swine Health and Production*, 23, 321-330.
- IBARRA, M.; NOÉ, N.; ALVARADO, A.; PERALES, R. 2000. Evidencia de la presencia de anticuerpos de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos provenientes de granjas de crianza artesanal del sur de Lima. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 11(2), 164-168.
- MAES, D.; SIBILA, M.; KUHNERT, P.; SEGALÉS, J.; HAESBROUCK, F.; PIETERS, M. 2018. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: knowledge gaps for improved disease control. *Transboundary and emerging diseases*, 65, 110-124.
- MAY, M.P.; SEIBANE, C. 2012. Cadena agroalimentaria de porcinos. Curso de Introducción a las Ciencias Agrarias y Forestales. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/43024>
- MARMUR, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyrinucleic acid from micro-organisms. *Journal Mol Biol* 3: 208-218.
- MATTSSON, J.G.; BERGSTROM, K.; WALLGREEN, P.; JOHANSSON K.e. 1995. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 33: 893-897.
- NATHUES, H.; WOESTE, H.; DOERING, S.; FAHRION, A.S.; DOHERR, M.G.; GROSSE BEILAGE, E. 2012. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nasal swabs sampled from pig farmers. *Veterinary record* 170(24):623.
- NATHUES, H.; WOESTE, H.; DOERING, F.; FAHRION, A.; DOHERR, M.; BEILAGE, E. 2013. Herd specific risk factors for *Mycoplasma Hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55:30.
- 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. *Veterinary Microbiology*, 145, 198-208.

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. *Veterinary microbiology*, 172(3-4), 575-580.

PIETERS, M.; DANIELS, J.; ROVIRA, A. 2017. Comparison of sample types and diagnostic methods for in vivo detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* during early stages of infection. *Veterinary microbiology*, 203, 103-109.

PULIDO, A.; MOGOLLÓN, J.D.; MORALES, H.J.; RINCÓN, M.A. 2006. Estandarización y aplicación de la técnica de PCR-Anidado para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 53(1), 22-32.

RUIZ, A.; PIJOAN, C. 2002. Use and interpretation of N-PCR from nasal swabs for *Mycoplasma hyopneumoniae* diagnosis. *Proceedings of the 17th IPVS Congress*, vol. 2, Iowa. 79 p.

SEGALÉS, J.; MARTINEZ, J.; CASTELLA, J.; DARWICH, L.; DOMINGO, M.; MA-TEU, E.; MARTIN, M.; SIBILA, M. 2013. Capítulo 5: Diagnóstico laboratorial de trastornos respiratorios. En: SEGALÉS, J.; MARTINEZ, J. (coord.). *Manual de diagnóstico laboratorial porcino*. Grupo ASIS Biomédica S.L. España. 44-52 pp.

SIBILA, M. 2013. *Mycoplasma Hyopneumoniae*: puntos críticos de la epidemiología y del diagnóstico. *Avances tecnológicos porcinos X* (9):25-30.

TAMIOZZO, P. 2009. Rol, uso e importancia de la nPCR en la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdas y su progenie luego de la aplicación de un programa de despoblación parcial (Doctoral dissertation, Tesis para optar al grado de Magister en salud y Producción Porcina).

TAMIOZZO, P.; LUCCHESI, P.; AMBROGI, A. 2011. Diversidad genética de *Mycoplasma Hyopneumoniae* en granjas porcinas de la Argentina. *In vet*, 13 (1):27-35.

THACKER, E. 2006. Mycoplasmal disease. En: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. (Eds.). *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames. 701-717 pp.

THACKER, E.; MINION, F. 2012. Mycoplasmosis. En: ZIMMERMAN, J.J.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.J.; STEVENSON, G.W. (Eds.). *Diseases of Swine*, 10th ed. Ames: Wiley-Blackwell Publishing. 779-798 pp.

ZEEH, F.; KUHNERT, P.; MISEREZ, R.; DOHERR, M.G.; ZIMMERMANN, W. 2005. Feldvalidierung einer real-time PCR zum Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae* in Nasentupfermaterial von lebenden Schweinen. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 147(9), 373-379.