



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

DIAGNÓSTICO DE *MYCOPLASMA SUIS* CON TÉCNICAS CONVENCIONALES Y
DE BIOLOGÍA MOLECULAR. SU RELACION CON CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2

AUTOR: MV. PINTOS, María Eugenia.

DIRECTOR: Dra. ARAUZ, María Sandra.

CO-DIRECTOR: Dr. POSIK, Diego Manuel.

LUGARES DE TRABAJO

Servicio Central de Laboratorio del Hospital de Clínicas, Instituto de Genética Veterinaria y Cátedra de Patología Especial. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. CERDÁ, Raúl O.
Dra. MACHUCA, Mariana A.
Dra. ROMANINI, Silvia.

Año 2016

DEDICATORIA

A Diego, a mis padres, hermanos, sobrinos y cuñados. Gracias por ayudarme y acompañarme en este recorrido. Los amo con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo en sus instalaciones.

A mi directora Sandra, mil gracias por haberme dejado desarrollar mi trabajo de tesis en su laboratorio. Por acompañarme en todas las etapas del trabajo, por transmitirme sus conocimientos, tiempo y compañerismo.

A mi codirector Diego, mil gracias por hacerme sentir parte del laboratorio de Genética. Por enseñarme con mucha paciencia una rama nueva para mí que era la de biología molecular. Por trabajar siempre a la par con las extracciones de ADN, amplificaciones, secuenciaciones, etc. Y siempre tener una actitud positiva durante todo el desarrollo de la tesis. A los dos por estar presentes y entender mis tiempos de trabajo.

A los miembros del jurado, Dres. Cerdá, Machuca y Romanini, los cuales desde el desarrollo del plan de tesis siempre estuvieron presentes y aconsejaron para mejorar y enriquecer el trabajo.

Al Dr. Carlos Perfumo por brindarme siempre con su humildad sus conocimientos y aconsejarme en el desarrollo y finalización de la tesis.

A la Dra. Estela Bonzo por estar siempre presente de manera desinteresada, ayudándome y brindándome sus conocimientos en el análisis estadístico del trabajo.

Al Dr. Javier Cappuccio por estar siempre dispuesto a colaborar con el muestreo en las granjas porcinas.

A los Dres. Guillermo Giovambattista y Pilar Peral García del IGEVET por permitirme siempre con buena predisposición trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Eduardo Pons y a mi amigo Dr. Daniel Arias por ayudarme en forma incondicional.

A la Dra. Cecilia Galosi por ayudarme en la corrección del manuscrito del plan de tesis.

A los Dres. Eduardo Gimeno, Luzbel de la Sota y Ale Stornelli gracias por incentivar-me en iniciar el camino de la investigación.

A la Dra. Cecilia Venturini y docentes de la cátedra de Inmuparasitología por permitirme hacer uso de los microscopios.

Al Dr. Enrique Portiansky y compañera de trabajo Romi Pretti por ayudarme en la toma de fotos de los preparados de los frotis sanguíneos.

A la Dra. Gabriela Giacobone gracias por colaborar en las técnicas de coloración de Naranja de Acridina.

Al Dr. Marcos Muriel por permitirme hacer uso de las instalaciones del Hospital Escuela FCV-UNLP para el trabajo experimental de la tesis y brindarme su ayuda en este último recorrido de la tesis. Quiero agradecer especialmente a Migue, Coqui y al Colo que me ayudaron con el mantenimiento de los box y con la extracción de las muestras de sangre en esta etapa.

A las Dras. Norma Pereyra y Marina Dibárbora, gracias por cederme gentilmente muestras de controles positivos y negativos para *M. suis* y para PCV-2.

A la Dra. Cecilia Carbone y docentes del Bioterio gracias por ayudarme en la obtención muestras de sangre de ratas y ratones.

A Nico Streitemberger y Walter Galván de la cátedra de Clínica de Grandes Animales gracias por ayudarme en la obtención de muestras de sangre de bovinos y ovinos.

A mis amigas y compañeras de trabajo Natalí Fauret y Carla Scodellaro, gracias por ayudarme en el procesamiento de las muestras y ser parte de esta tesis.

Lore Fontana y Romi Pretti por ayudarme en la obtención de muestras de sangre de caninos, felinos y bovinos.

A Laura Alarcón, alumnos y colegas de granjas porcinas gracias por ayudarme en la obtención de las muestras.

A la Dra. Sara Williams y Guido Príncipe gracias por su colaboración en la recolección de muestras de sangre en granjas porcinas semi-intensivas.

Al Dr. Manuel Fondevila Camps y amigos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Zaragoza por brindarme sus conocimientos y enriquecer este trabajo.

Gracias! a los no docentes que están todos los días trabajando a la par ayudando a facilitar nuestra tarea....en especial a mi querido amigo Migue Nucitelli que me acompaña todos los días en mi trabajo del Laboratorio, a Norma Grillo por estar siempre presente, a Lilian, Martin, Ale y Fabio.

A mis amigos y compañeros... gracias! Por ayudarme a culminar este trabajo: Lore Miglio, Fabi, Fede, Laura Gos, Flor, Walter, Ro, Ceci Stornelli, Ale, Cesar, Lore Martin, Machi, Daniela, Ceci Sanchez, Egle, Juli y Moni.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

Trabajos presentados en Congresos y Reuniones Científicas

-PINTOS, M.E.; POSIK, D.M.; SCODELLARO, C.F.; PERFUMO, C.J.; CAPUCCIO, J.; GIOVAMBATTISTA, G. y ARAUZ, M.S. Diseño de un método sensible para la detección de *Mycoplasma suis* mediante la técnica de PCR semianidada". : "XVIII Reunión Científico-Técnica." Mercedes-Corrientes. Argentina. 3,4 y 5-11-2010. Presentación poster.

-PINTOS, M.E.; POSIK, D.M.; FAURET, N.M.; SCODELLARO, C.F.; PERFUMO, C.; CAPPUCCIO, J.; GIOVAMBATTISTA, G., y ARAUZ, M.S. Estudio preliminar: Comparación en la identificación de *Mycoplasma suis* a través de hematología y biología molecular en cerdos de la Provincia de Buenos Aires. XIX Reunión Científico Técnica. CAVA, del 7 al 9-11-2012. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Presentación poster.

-PINTOS, M.E.; FAURET, N.M.; POSIK, D.M.; DIEZ, M.; ALLENDE, M.; CAPPUCCIO, J.; SCODELLARO, C.F.; PERFUMO, C. Y ARAUZ, M.S. Estudio de las variaciones hematológicas, bioquímicas y de PCR, en cerdos esplenectomizados provenientes de una granja con antecedentes de *Mycoplasma suis*." XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas 2013. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR. Jornada Latinoamericana. Presentación poster oral.

-PINTOS, M.; BONZO, E.; POSIK, D.; FAURET, N.; SCODELLARO, C.; PERFUMO, C. and ARAUZ, M. Prevalence of *Mycoplasma suis* in indoors and outdoors pig farms in

Buenos Aires Province by PCR. Proceedings of the 23rd IPVS Congress, Cancun, Mexico – June 8-11, 2014. P 495.

-PINTOS, M.; BONZO, E.; POSIK, D.; FAURET, N.; SCODELLARO, C.; FONTANA, L.; PERFUMO, C. Y ARAUZ, M. Prevalencia de *Mycoplasma suis* en granjas intensivas y semiintensivas de la provincia de Buenos Aires mediante la Técnica de PCR anidada”.

XX Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina Veterinaria de Laboratorio Diagnostico 27, 28 Y 29 de Noviembre, Tucumán 2014.

-PINTOS, M.E. Diagnóstico de anemia porcina producida por micoplasmas hemotróficos (*Mycoplasma suis* y *Mycoplasma parvum*). XII Curso de Actualización sobre Enfermedades Emergentes y Re-emergentes del Cerdo. 23 y 24 de Mayo, 2016. Laboratorio de Patología Especial Veterinaria. FCV-UNLP. Disertante.

Trabajo presentado en Revista con referato

-PINTOS, M.E.; SCODELLARO, C.F.; PERFUMO, C.J.; POSIK, D.M.; ARAUZ, M.S. Infección por *Mycoplasma suis* en el cerdo. Una revisión bibliográfica. *Analecta Veterinaria*. 2011; 31 (1): 40-46. Impresa ISSN 0365514-8. Electrónica ISSN 1514-2590.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE PUBLICACIONES.....	VI
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS.....	28
SECCIÓN 1	
Evaluación de la presencia de <i>M. suis</i> mediante estudios hematológicos con distintas coloraciones, caracterización del tipo de anemia y/o alteraciones en las concentraciones bioquímicas sanguíneas	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	50
SECCIÓN 2	
Estudios de PCR para la detección de <i>M. suis</i> en muestras de sangre.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
RESULTADOS	60
DISCUSIÓN.....	68
CONCLUSIONES.....	72
SECCIÓN 3	

Estudios de PCR para la detección de PCV-2 en muestras de sangre de animales vacunados y no vacunados y su asociación con <i>M. suis</i>	73
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
RESULTADOS	76
DISCUSIÓN.....	78
CONCLUSIONES.....	79
SECCIÓN 4	
Estudios anatomo-histopatológicos e inmunohistoquímicos de los animales seleccionados para el diagnóstico de infección por <i>M. suis</i> y PCV-2, en muestras de bazo y linfonódulos respectivamente	80
MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
RESULTADOS	82
DISCUSIÓN.....	86
CONCLUSIONES.....	87
CONCLUSIONES GENERALES.....	88
ANEXO 1	
Alineamiento de secuencias de las especies micoplasmas hemotróficos.....	90
ANEXO 2	
Protocolos de PCR.....	98
ANEXO 3	
Secuencias consenso de PCV-2.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	103

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μl: microlitro.

μm: micrometro.

‰: por mil.

A/G: relación albúmina/globulinas.

ADE: análisis exploratorio de los datos.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AST-GOT: aspartato aminotransferasa.

BT: baño térmico.

CA: consumo alimentario.

CMHbC: concentración media de la hemoglobina corpuscular.

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato.

E: especificidad.

EDTA: ácido etilen diamino tetraacético.

EE-PCV-2: enfermedad entérica asociada a PCV-2.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

EP-PCV-2: enfermedad pulmonar asociada a PCV-2.

ER-PCV-2: cuadros reproductivos asociada a PCV-2.

EV: vía endovenosa.

FAL: fosfatasa alcalina.

FLA: fórmula leucocitaria absoluta.

FLR: fórmula leucocitaria relativa.

G: fuerza gravitatoria.

g/dl: gramos por decilitros.

GAPDH: deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato.

GDP: ganancia diaria de peso.

GGT: gama glutamil transferasa.

GI: granjas intensivas.

GR: glóbulos rojos.

GSI: granjas semi-intensivas.

h: hora.

HbCM: hemoglobina corpuscular media.

HE: hematoxilina y eosina.

HP: hemoplasmosis porcina.

IFCC-UV: Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico, método cinético.

IFI: técnicas de Inmunofluorescencia indirecta.

IgG: inmunoglobulina G.

IgM: inmunoglobulina M.

IHA: prueba de inhibición de la hemaglutinación.

IHQ: inmunohistoquímica.

IM: vía intramuscular.

IS-PCV-2: infección subclínica asociada a PCV-2.

IV: índice de conversión.

kg: kilogramo.

M: molar.

mM: milimolar

mg/ml: miligramos por mililitros.

mg: miligramo.

MGG: May Grünwald-Giemsa.

MIA: ensayos multiplex microbead.

min: minuto.

ml: mililitro.

mm: milímetro.

NA: Naranja de Acridina.

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

nm: nanómetro.

ORF: Marco abierto de lectura "Open readign frame".

pb: pares de bases.

PBS: solución de buffer fosfato.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PCRs: reacciones en cadena de la polimerasa.

PCV-2: circovirus porcino tipo 2.

PCV-2-AD: enfermedades asociadas a circovirus porcino tipo 2.

PRC: porcentaje de reticulocitos corregido.

PRSS: síndrome respiratorio y reproductivo porcino.

p.v: peso vivo.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

rpm: revoluciones por minuto.

S: sensibilidad.

SB: southern blot.

SDNP: síndrome de dermatitis y nefropatía porcino.

seg: segundo.

SFM: sistema fagocítico mononuclear.

SMAP: síndrome multisistémico de adelgazamiento postdestete.

sp.: especie concreta cuyo epíteto específico es desconocido

TTV 1: Torque Teno Virus en porcinos 1.

TTV 2: Torque Teno Virus en porcinos 2.

UI/L: unidad internacional por litro.

VCM: volumen corpuscular medio.

VR: valor de referencia

vs: versus.

X²: Chi cuadrado.

DIAGNÓSTICO DE *MYCOPLASMA SUIS* CON TÉCNICAS CONVENCIONALES Y DE BIOLOGÍA MOLECULAR. SU RELACION CON CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2

PALABRAS CLAVES: *Mycoplasma suis*, cerdos, circovirus porcino tipo 2, anemia.

RESUMEN

La hemoplasmosis porcina (HP), es una enfermedad de distribución mundial producida por *Mycoplasma suis*, que provoca anemia hemolítica en los cerdos. El objetivo del trabajo fue realizar el diagnóstico de *M. suis*, a través de estudios hematológicos y de técnicas de biología molecular así como determinar su relación con circovirus porcino tipo 2 (PCV-2). El estudio incluyó 482 cerdos de distintas categorías provenientes de 30 establecimientos. Además se realizaron estudios anatomopatológicos e inmunohistoquímicos (IHQ) en 44 animales positivos a *M. suis*, que murieron en el período de estudio. Los mismos presentaban signología asociada a PCV-2. Se obtuvieron datos productivos, sanitarios y de manejo de cada uno de los establecimientos. Por último se realizó un análisis exploratorio de los datos recolectados mediante software de dominio público EpiInfo™, Epidat versión 4.0. Mediante los resultados del estudio hematológico se pudo observar anemia en el 59,7% de animales, siendo el 34% positivos a *M. suis*. Las categorías más afectadas fueron lechones y recría. En los frotis teñidos con May Grünwald-Giemsa se observó un mayor porcentaje de animales positivos a *M. suis* con respecto a la coloración de Naranja de Acridina. La técnica de PCR diseñada para detectar *M. suis* permitió identificar un 36% de animales positivos. Mediante la técnica de PCR para PCV-2, se pudo identificar un 31,7% de animales positivos en el total de la

población. Se observó que el 8,7% de los animales infectados naturalmente con *M. suis* eran también PCV-2 positivos. Mediante la técnica de IHQ se pudo demostrar inmunomarcación positiva para PCV-2 en el 70,5% de los casos sospechosos PCV-2-AD en las muestras provenientes de animales no vacunados y positivos a *M. suis*. Se concluye que los estudios hematológicos brindan información sobre la presencia de la bacteria como también de las alteraciones en la morfología celular sanguínea. Hasta donde sabemos, y según la bibliografía consultada, este sería el primer diseño y puesta a punto de una técnica de PCR específica para *M. suis* realizada en nuestro país. Estas técnicas son una herramienta de diagnóstico relativamente rápidas y junto con la signología clínica permiten tomar medidas preventivas y/o de tratamiento en las granjas porcinas.

DIAGNOSTIC THE *MYCOPLASMA SUIS* WITH CONVENTIONAL TECHNIQUES AND MOLECULAR BIOLOGY. YOUR RELATIONSHIP PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2

KEY WORDS: *Mycoplasma suis*, pigs, porcine circovirus type 2, anemia.

SUMMARY

Swine hemoplasmosis (SH) is a worldwide disease caused by *Mycoplasma suis*, which brings hemolytic anemia in pigs. The aim of this work was to make the diagnosis of *M. suis* through hematological studies and molecular biology techniques as well as to determine their association with porcine circovirus type 2 (PCV-2). A total of 482 pigs samples of different categories were taken from 30 pig farms. Besides, anatomo-pathological and immunohistochemistry (IHC) studies were performed in 44 dead animals during the period, with signology associated with PCV-2 and positive to *M. suis*. On each farms production, health and management data were taken. However, an exploratory analysis of the collected data was performed by using public domain software EpiInfoTM, Epidat version 4.0. Hematological results showed anemia in 59.7% of the animals where 34% were positive to *M. suis*. The most affected categories were piglets and preweaning pigs. On smears stained with May Grünwald-Giemsa, a higher percentage of animals positive to *M. suis* was observed, regarding orange acridine staining. The PCR technique designed to detect *M. suis* presented an overall prevalence of 36% of positive animals. The PCR technique to detect PCV-2 presented of 31.7% of positive animals in the total population. It was observed that 8.7% of naturally infected with *M. suis* animals were

also PCV-2 positive. The IHC test confirmed 70.5% of suspected cases PCV-2-AD, *M. suis* positive unvaccinated animals. In conclusion the hematological studies provide information about bacteria presence, as well as changes in blood cellular morphology. To our knowledge, and according to the literature, this would be the first design and development of specific PCR technique for *M. suis* help in Argentina. Techniques used in this work are relatively a quick tool to be applied for diagnosis. These data along with the clinical symptoms, allow taking treatment and preventive measures in pig farms.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Infección por *Mycoplasma suis* en el cerdo: una actualización

La hemoplasmosis porcina (HP), anemia infecciosa de los cerdos o llamada anteriormente, eperithroozonosis porcina es una enfermedad de importancia mundial, que causa anemia hemolítica en los cerdos y produce grandes pérdidas económicas (Ritzmann y col., 2009; Stadler y col. 2014).

El agente etiológico de la enfermedad, es la bacteria *Mycoplasma suis*, antes denominada *Eperythrozoon suis*. Su presentación clínica puede ser aguda o crónica. La primera se manifiesta principalmente en lechones y se caracteriza por fiebre, ictericia y anemia con baja morbilidad y alta mortalidad, así como una mayor predisposición a los problemas respiratorios y digestivos (Gwaltney y col., 1995; Machuca y col., 1999; Gaunt y col., 2000). La segunda, se manifiesta en forma asintomática con leve ictericia y anemia en los recién nacidos, retardo en el crecimiento en los animales en engorde y baja performance productiva en el pie de cría, por infecciones entéricas y respiratorias, probablemente debido a la supresión de las funciones de los linfocitos T (Anziani y col., 1986; Gresham y col., 1996; Henderson y col., 1997; Zachary y col., 1985). En reproductores está asociada a fallas reproductivas tales como ciclos irregulares, anestro y fallas en la concepción (Zinn y col., 1983).

En los últimos años se ha reportado la infección por *M. suis* en cerdos silvestres en Europa. En cambio en cerdos domésticos, además del continente

mencionado, se halló en Estados Unidos, América del Sur y Asia (Guimaraes y col. 2007; Ritzmann y col. 2009; Yuan y col. 2009; Hoelzle y col. 2010).

La primera descripción de la infección se realizó en Estados Unidos en 1930 (Hoelzle y col., 2014), donde se reportaron casos de anemia e ictericia en los cerdos. Entre los años 1950 y 1963 Splitter identificó a estos microorganismos como los responsables de producir anemias hemolíticas en cerdos, los clasificó como rickettsias y los denominó *E. suis* (Neimark y col., 2001).

En 1975, Smith y Tamra realizaron un trabajo de diagnóstico con la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA), donde revelaron que entre el 15-40% de los cerdos de Estados Unidos estaban infectados con *M. suis*. Más tarde se observó que la prevalencia detectada con esta técnica no era real, debido a que se obtenían resultados con un alto porcentaje de falsos negativos (Baljer y col., 1989).

En 1984, Kreier y Ristic mencionaron a *M. suis* o *E. suis* como el microorganismo más grande de las bacterias hemotróficas (Neimark y col., 2001). En el siguiente año, Zachary y col., comenzaron a trabajar en el diseño del modelo experimental de la infección de *M. suis*, donde se observó el pico de parasitemia en los animales esplenectomizados y recaídas en los cerdos portadores. Más tarde Heinritzi y col., en 1990 siguieron trabajando con el modelo experimental de Zachary con algunas modificaciones (Hoelzle y col., 2014). Zulty y col., en (1990); Schmidt y col., (1992) reportaron la presencia de crioaglutininas en el pico de bacteriemia. En ese mismo año, Hsu y col., comenzaron a desarrollar pruebas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección de *M. suis*. Gwaltney y col., (1993); Oberst y col., en 1993; Gwaltney y col., (1995) trabajaron en la detección de *M. suis* mediante sondas KSU-2 de hibridación en muestras

provenientes de animales infectados experimentalmente, obteniendo alta sensibilidad en sus resultados.

Rikihisa y col., en 1997 reportaron que la secuencia del gen 16S ARNr de “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” de Taiwán era idéntica a la de “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” de Illinois.

Messick y col., 1999 desarrollaron una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de *M. suis*. Hoelzle y col., en el 2003 trabajaron en el desarrollo de extracción y análisis del ADN en cerdos infectados experimentalmente, debido a que hasta ese momento solo estaba disponible en el banco de datos la información de secuencia de un fragmento de 1436 pb del gen ribosomal 16S de *M. suis* cepa Illinois y de 1374 pb del gen 16S de *M. suis* cepa Zachary (Rikihisa y col., 1997; Messick y col., 1998; Messick y col., 1999).

En el año 2007d Hoelzle y col., diseñaron la técnica reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), amplificando genes codificantes de la proteína msg1 de *M. suis*, con el fin de utilizarla en el monitoreo del tratamiento con antibióticos en la infección aguda. En Alemania, en el año 2009, Ritzmann y col., determinaron con la misma técnica una prevalencia de *M. suis* de 13,9% en cerdos de 20-30 kg y 40,3% en 79 granjas en ese país. Este estudio expuso que *M. suis* estaba subdiagnosticado, causando pérdidas económicas en la industria porcina. Ambos autores utilizaron una qPCR de alta sensibilidad y especificidad, pero con la desventaja de no poder ser utilizada como diagnóstico de rutina en todos los laboratorios, debido al mayor costo y complejidad del equipo necesario para las determinaciones.

En el año 2011, Oehlerking y col., lograron determinar el tamaño del genoma por secuenciación en la cepa *M. suis* KI3806 de 709,270 pb. Ese mismo año Messick y col., publicaron el genoma de la cepa *M. suis* str. Illinois de 742,431 pb. Los ensayos de PCR convencional disponibles hasta el momento fueron probados solo en animales de experimentación con resultados dispares y de baja repetibilidad y no como herramienta diagnóstica de rutina. Guimaraes y col., en ese mismo año, desarrollaron otra técnica de qPCR TaqMan, con el fin de poder ser utilizada como método de rutina, observándose 7,5 % de animales positivos a *M. suis* en Indiana. Con métodos similares se determinó una prevalencia de 80% en Brasil, 86% en China y 5% en Japón (Yuan y col., 2009; Watanabe y col., 2012).

En Argentina se describió por primera vez la presencia de *M. suis* en la provincia de Santa Fe en 1986 en un cerdo con diagnóstico presuntivo de neumonía (Kloster y col., 1985; Anziani y col., 1986). En el año 1999, Machuca y col., describieron un brote de eperitrozoosis en la provincia de Buenos Aires en cerdos criados en forma semi-intensiva. El mismo se caracterizó por retraso en el crecimiento y aumento en la mortandad en las categorías de desarrollo y terminación, observándose *M. suis* en frotis sanguíneos teñidos con May Grünwald-Giemsa también en otras categorías como madres y lechones. En el 2002 Arauz y col., reportaron la transmisión del microorganismo por vía transplacentaria, a través de estudios hematológicos de madres y lechones de pocas horas de vida.

En el año 2004, Pereyra y col., evaluaron 285 muestras de sangre provenientes de las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires, por PCR convencional, los resultados mostraron que el 65% eran positivas a *M. suis*, con una distribución del 56,4%; 70,8% y 83,6% respectivamente. Y en el 2006 Pereyra y col.,

describieron casos clínicos en donde *M. suis* y circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) se manifestaban en forma conjunta. Se obtuvieron datos clínicos y epizootiológicos de tres granjas: la granja uno de cerdos de terminación, la granja dos y tres de criaderos al aire libre, de madres y ciclo completo. Se realizaron estudios anatomopatológicos, hematológicos, bacteriológicos e histopatológicos. En los estudios hematológicos de los animales con sintomatología, observaron valores de hematocrito inferiores al valor de referencia de la especie. Se observaron en los frotis, formas cocoides compatibles con *M. suis*. Este estudio comunica por primera vez la coexistencia de *M. suis* y síndrome multisistémico de adelgazamiento postdestete (SMAP), una de las entidades asociadas a la infección por PCV-2 (PCVAD) (Pereyra y col., 2004; Segalés y col., 2004; Segalés y col., 2012).

En casos de campo *M. suis* y el SMAP pueden manifestarse simultáneamente en una granja; inclusive con la posibilidad de que esta asociación produzca cuadros clínicos más severos. Es importante confirmar la presencia de *M. suis* en casos de SMAP e incluir la antibioticoterapia adecuada para poder prevenir infecciones secundarias (Pereyra y col., 2009). En el año 2006, Arauz y col., reportaron el diagnóstico de *M. suis* como causa de pérdida de peso en lechones lactantes. En el 2011 Pereyra y col., evaluaron la sensibilidad (S) y especificidad (E) mediante las técnicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y de PCR, obteniendo una S=98% y E=95% con la técnica de PCR y una S=68% y E=78% con la técnica de IFI.

1.2.- Agente etiológico en los cerdos

Según la última actualización del “Subcomité de Taxonomía de los Mollicutes” 2003, este microorganismo hoy se incluye dentro de la familia *Mycoplasmataceae*,

género *Mycoplasma*, junto con otras bacterias hemotróficas. (Neimark y col., 2001; Neimark y col., 2002; Cerdá, 2007). Se caracteriza por ser altamente especializado y pertenece al grupo de los hemoplasmas no cultivables. Es pleomórfico, de un tamaño de 0,2 a 2,5 μm de diámetro. Se observan en forma de coco-bacilos o de anillos basófilos, adheridos a la superficie de los eritrocitos porcinos en los frotis sanguíneos (Messick y col., 2004). Hasta el momento *M. suis*, y el resto de los micoplasmas hemotróficos no se han podido cultivar. Si bien se han realizado varios intentos, todos han fracasado (Hoelzle y col., 2014). La investigación del microorganismo siempre se realizó en animales esplenectomizados, infectados experimentalmente con sangre proveniente de un animal enfermo, para intentar reproducir la enfermedad. Si bien en cultivos celulares se pudo mantener a los microorganismos, hasta ahora no se ha logrado que se dividan en estas condiciones (Nonaka y col., 1996; Schreiner y col., 2012a).

En el año 1950, Splitter había reportado dos microorganismos en cerdos *E. suis* y *E. parvum*. Durante muchos años se pensó que era una sola especie que cambiaba de forma y tamaño a medida que maduraba (Splitter y col., 1950; Pereyra y col., 2004).

En el 2011 mediante el análisis de un clúster genético se identificó a *E. parvum* como un micoplasma distinto del resto. El mismo se consideró el hemoplasma más pequeño de todas las especies hemotróficas de un tamaño aproximado 0,2-0,5 μm con un cromosoma circular de 564,395 pb. Este estudio permitió diferenciar a las dos especies mediante su morfología y patogenicidad (Watanabe y col., 2011). En el año 2013, luego de la secuenciación del genoma del *E. parvum* se lo clasificó como una especie diferente de *M. suis* y se lo denominó

formalmente *M. parvum* (Do Nascimento y col. 2013; Do Nascimento y col., 2014). En los frotis sanguíneos, estos se observaban como cocos bacilos infectando pocos eritrocitos y se caracterizaban por ausencia de signos clínicos, aún en animales esplenectomizados, mientras que *M. suis* causaba en el cerdo bacteriemia, icterioanemia, pudiendo llevar a la muerte en la presentación aguda de la enfermedad (Do Nascimento y col. 2014).

1.3.- Patogenia

Los mecanismos de patogenicidad son complejos y genéticamente aún no se conocen, debido a que no se pueden hacer cultivos *in vitro*, por tal razón se evalúan a través de animales de experimentación (Hoelzle y col., 2014).

La anemia hemolítica producida en los cerdos por *M. suis* puede ser leve-moderada o severa, dependiendo de la carga bacteriana en el hospedador. Las anemias hemolíticas también pueden clasificarse en intra o extravasculares. Si bien la mayoría de las anemias son el resultado de una combinación de ambas, siempre hay una que predomina, siendo interesante conocer el sitio donde se produce la destrucción celular (Gaunt SD, 2000; Pintos, col., 2006).

En la hemólisis intravascular, los eritrocitos son destruidos dentro de la circulación, liberando hemoglobina al plasma donde es eliminada por el hígado o excretada por los riñones. Al cabo de 2 a 3 días se observa un aumento de la concentración media de la hemoglobina corpuscular (CMHbC), con la consiguiente hemoglobinuria, que es cuando la cantidad de hemoglobina libre supera la haptoglobina disponible, sobrepasando la capacidad de reabsorción tubular renal, e hiperbilirrubinemia, cuando se excede la capacidad del hígado de eliminar la

hemoglobina del plasma con un aumento de la bilirrubina indirecta o no conjugada. Los disturbios donde a veces ocurre una hemólisis intravascular significativa incluyen anemias inmunomediadas las que involucran inmunoglobulina M (IgM), daño oxidativo y alteraciones microangiopáticas. En la mayoría estas condiciones, no obstante, la destrucción de los glóbulos rojos (GR) toma lugar primariamente mediante el incremento de la fagocitosis (Gaunt SD, 2000; Scodellaro y col, 2006).

En las anemias hemolíticas extravasculares, los eritrocitos dañados son secuestrados a nivel de las células del sistema fagocítico mononuclear (SFM) del hígado y bazo, donde, en ocasiones éstas células eliminan parcialmente la membrana del eritrocito (fragmentos) y otras veces causan la destrucción celular total o acortan la vida media del GR (Pintos y col, 2006; Hoelzle y col., 2008; Felder y col., 2012; Sokoli y col., 2013; Hoelzle y col., 2014).

Si bien inicialmente los estudios ultraestructurales revelaron la deformación de los eritrocitos infectados sin daño celular (Pospichil y Hoffmann 1982, Portiansky y col., 2004), en investigaciones recientes se observa que los micoplasmas se adhieren a la membrana del eritrocito con deformación e invaginación del mismo. Esta interacción eritrocito-microorganismo produce un daño irreversible en el glóbulo rojo, dando como resultado una hemólisis extravascular. Asimismo, esta unión es necesaria para la replicación celular (Groebel y col., 2009; Hoelzle y col., 2014).

Si bien no está del todo claro el proceso de adhesión, hasta ahora se conocen dos adhesinas encargadas de la unión microorganismo-célula: MSG1 y α enolasa.

La primera tiene una función enzimática participando en el catabolismo de los carbohidratos y la segunda es una proteína de adhesión de los micoplasmas a los eritrocitos. La primer enzima identificada fue la MSG1, esta enzima es una

deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH) que cataliza la conversión de gliceraldehído-3-fosfato a D-glicerato 1,3-bifosfato durante la glucólisis. También esta enzima cumple su función en la superficie del eritrocito ayudando a la adhesión junto con la α enolasa. Esta última cataliza la reacción de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, que se localiza en la superficie de la membrana celular. Los anticuerpos anti-MSG1 y los anti- α enolasa bloquean la función de adhesión. Esto demuestra que ambas enzimas juegan un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad (Hoelzle y col., 2007d; Schreiner y col., 2012a-b; Felder y col., 2012).

La proteína P97 se encuentra también junto con MSG1 y α enolasa en la adhesión de *M. suis*-eritrocito, aunque no se pudo determinar su concentración durante la fase aguda de la infección (Felder y col., 2012). Esta proteína también se encuentra presente en *Mycoplasma hyopneumoniae* pero solo cumpliría su función como fijación luego de la adhesión.

Con el análisis del genoma se pudieron encontrar otras tres proteínas relacionadas con la adhesión: MgpA, MgpB y MgpC. En *M. suis* solo se pudo observar MgpA en la infección aguda (Hoelzle y col., 2014). Hasta el año 2009 se sabía que los eritrocitos presentaban en su membrana receptores para las proteínas de adhesión de micoplasmas y que estos se podían encontrar libres en el plasma o adheridos a la superficie de las células blanco, no encontrándose en forma intracelular. Groebel y col., en el 2009 describieron por microscopia electrónica que si bien los microorganismos se pueden hallar libres en el plasma, adheridos a la superficie de los eritrocitos, también se pueden encontrar en forma intracelular mediante invaginación del GR hasta la formación de vacuolas (semejante al

mecanismo de invaginación de otros microorganismos como por ejemplo: *Plasmodium falciparum* y *Bartonella bacilliformis* (Benson y col., 1986; Haldar y Mohandas, 2007).

Con el análisis genómico, aún no se han podido observar los factores responsables de la deformación e invaginación y formación de las vacuolas intracelulares. Conocer que *M. suis* se encuentra en forma epicelular e intracelular ayudará a elegir el antibiótico adecuado en el control o prevención de la infección.

Este análisis, sugiere un nuevo mecanismo de inducción de la anemia producida por *M. suis* donde se observa que este microorganismo compite por los nutrientes como: glucosa, inosina, hipoxantina, NADH y NADPH. Esta situación, lleva a un estrés oxidativo con la consiguiente muerte celular de los eritrocitos, aunque todavía no está muy claro cómo *M. suis* capta estos nutrientes (Guimaraes y col., 2011a).

La adhesión, invaginación y daño en la membrana del GR descrito anteriormente son semejantes a las de la eriptosis normal. Las características físicas de la eriptosis son: reducción celular, con formación de ampollas, microvesiculación, activación de proteasas y liberación de fosfatidilserina fuera de la célula, reconocimiento de los macrófagos a los eritrocitos y la fagocitosis correspondiente (Felder y col., 2011; Hoelzle y col., 2014). La tasa de eriptosis y su frecuencia está directamente relacionada con la virulencia de la cepa del microorganismo presente. Por todo lo expuesto, la eriptosis podría reducir la bacteriemia y por consiguiente prevenir la proliferación de *M. suis* en sangre en cerdos infectados con cepas de baja virulencia y que cursan con anemia leve-moderada (Felder y col., 2011). A pesar del análisis comparativo de las secuencias

de las dos cepas de *M. suis* (*M. suis* KI3806 y *M. suis* Illinois), no se han identificado genes que puedan codificar factores de virulencia o en la lisis directa de los eritrocitos *M. suis* KI3806 y *M. suis* Illinois. Los micoplasmas y los eritrocitos infectados se unen a las células endoteliales en forma individual o formando microcolonias “biofilm”, produciendo modificaciones en la membrana endotelial. La formación de microvellosidades contribuye a la alta adherencia de los micoplasmas, con disminución del flujo sanguíneo, modificación en la membrana y alteración en la coagulación. Los signos clínicos que se observan junto con la anemia son: coagulopatías, trombosis vascular y diátesis hemorrágica (Hoelzle y col., 2014).

Por todo lo expuesto, la patogenia de la enfermedad producida por *M. suis* es compleja. El microorganismo presenta factores patogénicos bien desarrollados, capaces de inducir signos clínicos e infecciones persistentes cíclicas. La anemia es el signo más destacado en esta enfermedad. Hasta el momento los mecanismos patogénicos de esta enfermedad se pueden dividir en dos categorías: el primero se basa en la interacción directa de adhesión, invasión y captación de nutrientes entre el microorganismo y los eritrocitos y el segundo responde a la respuesta inmunológica mediada por los autoanticuerpos IgM e inmunoglobulina G (IgG) que inducen a la lisis de los GR, produciendo anemia hemolítica (Hoelzle y col. 2014).

1.4.- Inmunopatología

Los mecanismos inmunopatológicos juegan un papel importante en la anemia durante la infección en los cerdos, tanto en las anemias hemolíticas intra y extravasculares. Durante la interacción entre *M. suis* y la membrana eritrocitaria se produce la liberación de antígenos extraños por el sistema inmune. Se producen así

autoanticuerpos (aglutininas frías del tipo de las IgM), que se unen a los eritrocitos de los animales infectados. Las crioaglutininas son las responsables de los efectos observados en la infección aguda de los cerdos, como cianosis y necrosis periférica en el extremo de las orejas donde la temperatura es menor. Cuando la sangre vuelve a la circulación central se revierte la aglutinación quedando los GR susceptibles al SFM. Las crioaglutininas están presentes en la infección aguda en los cerdos y en las infecciones crónicas con baja carga bacteriana y con picos de bacteriemia. La unión de autoanticuerpos IgM a los eritrocitos infectados induce a la activación de la coagulación intravascular diseminada iniciando el efecto de cascada con la activación del complemento C3b, produciendo anemia hemolítica. Los eritrocitos infectados se eliminan de circulación principalmente en bazo y por el SFM dando una hemólisis extravascular con aumento de la bilirrubina indirecta. En las anemias leves con presentación de infecciones agudas, las IgG inducen destrucción de GR (hemólisis intravascular) (Felder y col., 2010; Hoelzle y col., 2014).

1.5.- Signología clínica

La enfermedad en su presentación aguda cursa con fiebre, debilidad, anemia hemolítica, hipoglucemia, cianosis con necrosis periférica en el extremo de las orejas, coagulopatías, trombosis vascular y diátesis hemorrágica. En su presentación crónica cursa con infecciones intercurrentes subclínicas, anemia en lechones de maternidad, retraso en el crecimiento en recría y engorde, en las hembras, fallas reproductivas (Hoelzle y col., 2014), disgalactia (Strait y col., 2012), alteración de la conducta maternal, así como la presentación de abortos y natimortos (Henry y col.,

1979; Brownback y col., 1981; Zinn y col., 1983; Heinritzi y col., 2000; Weissenbacher-Lang y col., 2012).

La enfermedad también incluye otros síndromes como aumento de la incidencia de infecciones respiratorias y digestivas en todas las categorías, especialmente en recría y terminación. Aunque *M. suis* está ampliamente distribuido en la población porcina, son necesarios ciertos factores de riesgo para que se manifieste la infección. Se considera que existe asociación entre la aparición de enfermedades producidas por hemoplasmas y la existencia de enfermedades virales, neoplásicas e inmunomediadas.

En los cerdos se han observado casos asociados a infecciones por virus de la peste porcina clásica, estreptococosis, toxoplasmosis y en criaderos, SMAP y síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRSS) (Henry y col., 1979; Pereyra y col., 1990; Heinritzi y col., 2000; Messick y col., 2004; Pereyra y col., 2004). En felinos, especie donde también se observa una micoplasmosis similar a la del cerdo, existen varios trabajos que mencionan la asociación entre las infecciones producidas por hemoplasmas y las enfermedades virales, neoplásicas e inmunomediadas, principalmente (Neimark y col., 2002; Messick y col., 2004; Willi y col., 2005; Willi y col., 2006; Willi y col., 2007; Campos Aquino y col., 2014; Hoelzle y col., 2014).

1.6.- Diagnóstico

Debido a que *M. suis* no se puede cultivar, el diagnóstico de la infección se realiza sobre la base del cuadro epidemiológico, los signos clínicos, los estudios anatomopatológicos, hematológicos y bioquímicos.

Si bien, como se describe en la introducción, los métodos más utilizados de diagnóstico son PCR y qPCR. Zhang y col., 2012 usaron la técnica de ELISA para la detección de *M. suis* en la manifestación aguda de la enfermedad. Con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 100%. En forma contemporánea se realizó un análisis de proteomas mediante la técnica de espectrometría de masas, para identificar las proteínas de *M. suis* durante la infección aguda. Se comprobó que del 65,3% de proteínas que presenta *M. suis* (cepa Illinois) y del 65,9% (cepa KI_3806) solo 6,3% fueron identificadas en este análisis. Este estudio se hizo para poder entender el ciclo de la patogénesis y de vida de *M. suis* en cultivos *in vitro* (Felder y col., 2012).

En China en el año 2013 mediante estudios inmunocromatográficos trabajaron con muestras de plasma de cerdos como diagnóstico rápido y sencillo de identificación de *M. suis*. Los resultados demostraron baja sensibilidad diagnóstica, no reemplazando los métodos de ELISA y PCR (Meng y col., 2014). Dietz y col., en el (2014) desarrollaron una técnica de qPCR para identificar *M. suis* en la fase temprana de la infección. Además, en ese mismo año se desarrollaron técnicas de ensayos multiplex microbead (MIA), donde se observó que esta técnica era más sensible y específica que la prueba de IHA y qPCR, ya que proporcionó además una evaluación simultánea de la respuesta de los anticuerpos frente a los antígenos de *M. suis* (Guimaraes y col., 2014).

1.7.- Tratamiento y prevención

Para el tratamiento de esta infección las tetraciclinas han sido utilizadas para reducir la bacteriemia y reducir los signos clínicos más severos de la enfermedad,

sin embargo no logran eliminar completamente al microorganismo. Los animales que sobreviven a la enfermedad habiendo cursado con anemia aguda, pueden seguir como portadores de *M. suis* una vez finalizado el tratamiento (Splitter y col., 1957; Heinritzi y col., 2000; Pereyra y col., 2011).

Actualmente se utiliza la oxitetraciclina inyectable para los cerdos de cuadros agudos y en el alimento para el resto del lote (Pereyra y col., 2011). Asimismo, sugieren para disminuir la disgalactia administrar clortetraciclina en la alimentación a una dosis de 22 mg/kg/día durante dos semanas en cerdas gestantes primerizas y dejar de administrar tres semanas antes del parto (Strait y col., 2012).

La tilosina y la enrofloxacin también han sido utilizadas en el tratamiento de las diferentes micoplasmosis. La tilosina ha sido utilizada en la eperitrozonosis de los terneros esplenectomizados y está indicada en la micoplasmosis de los cerdos. La enrofloxacin se considera efectiva en el tratamiento de la neumonía producida por *M. hyopneumoniae* y se utilizó con éxito en la hemoplasmosis felina producida por *M. haemofelis*, pero no es efectiva para *M. suis*, tal como se comprobó en los cerdos infectados esplenectomizados y en los de campo. La tilosina se utiliza en 3 dosis diarias de 10 mg/kg IM, y enrofloxacin 2 dosis de 5 mg/kg IM cada 12 h (Pereyra y col., 2010).

Las medidas de profilaxis y soporte que se deberían incluir en el manejo de las granjas porcinas son:

- Selección de antibióticos de acuerdo al tipo de granja y cantidad de animales/granja con respecto a la vía de administración, forma de presentación de la enfermedad (aguda o crónica) y tratamientos de antibióticos previos.

- Uso de material descartable y estéril (jeringas y agujas).
- Lavado y desinfectado del instrumental contaminado (bisturís, pinza para descolmillar y tijeras manuales o de cauterización para corte de colas).
- Desinfección frecuente dentro y fuera de las salas, pisos y paredes.
- Control de vectores hematófagos principalmente en verano y otoño (Song., y col 2014).
- Control de perros, gatos, ovejas, dentro de las granjas porcinas. Por posibles coinfecciones con otros patógenos.
- Evitar en animales de terminación la sobrepoblación por corral que conlleva al canibalismo (Pereyra, 2010).
- Control de roedores e insectos (Song y col., 2014).
- Incorporación al plantel de animales libres de *M. suis* evaluados por la técnica de PCR.
- Realizar controles periódicos mediante los signos clínicos y hematológicos (Stadler y col., 2014).

1.8.- Relación entre *M. suis* y PCV-2

Actualmente, existe muy poca información sobre la relación entre *M. suis* y PCV-2 (Pereyra y col., 2006; Watanabe y col., 2012). Este virus se describió por primera vez en 1974 como un contaminante de la línea celular PK-15 obtenida a partir de riñón de cerdo (Tischer y col., 1982). Inicialmente se consideró como no patógeno (Tischer y col., 1986). En el año 1998, aislaron una variante del PCV en

cerdos afectados por el SMAP (Allan y col., 1999a; Allan y col., 1999b; Ellis y col., 1998), se caracterizaba por retraso en el crecimiento, incremento de la mortalidad, ictericia y lesiones microscópicas características en múltiples órganos, principalmente en órganos linfoides. (Clark, 1997; Rosell y col., 1999). La secuenciación de los dos virus mostró una divergencia genética significativa y de ahí que posteriormente el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus sugirió llamar al PCV no patógeno como circovirus porcino tipo 1 (PCV-1) y a la otra variante asociada con la enfermedad clínica como circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) (Segalés y col., 2012). El PCV-2 pertenece al género *Circovirus*, familia *Circoviridae*, es un virus pequeño, de unos 17 nm de diámetro, simetría icosaédrica, no envuelto y con genoma ADN circular de una sola cadena con polaridad negativa de aproximadamente 1757 pb (Mankertz y col., 2000).

El PCV-2 es, dentro de los virus ADN, el de mayor capacidad de mutar (1.2×10^{-3} /sitio/año) sumado a que su circulación en una población con alta presión inmune promoverá la aparición de nuevas variantes, siendo de esperar cambios en su patogenicidad y el resurgimiento cuadros clínicos patológicos.

Según el consorcio de PCVD (www.pcvd.net) se propuso utilizar una clasificación unificada de la nomenclatura de PCV-2 de acuerdo a la secuencia del ORF2.

Sobre esa base, genotípicamente el PCV-2 se clasificó en:

- a) PCV-2a (el genotipo inicial).
- b) PCV-2b (relacionado con la presentación de alta morbimortalidad en USA a partir del 2005).

c) PCV-2c (sólo detectado en estudio retrospectivo en Dinamarca y sin circulación en condiciones de campo hasta su reciente identificación en cerdos silvestres en el pantanal de Brasil) (Giovanni y col., 2015).

d) PCV-2d (cuyo origen se remonta a Suiza en 1998). A su vez se lo divide en PCV-2d-1 y PCV-2d-2. Su prevalencia es mayor en Asia y ahora en América del Norte. Otras variantes incluyen genotipo PCV-1/2 (Gagnon y col. 2010).

Estudios recientes realizados en China demuestran la coinfección en cerdos con SMAP por más de un genotipo (Zhai y col 2014).

En Argentina se identificó en el año 2000 PCV-2b y recientemente PCV-2d (Sarradel y col., 2004; Pereda y col., 2011).

En la infección por PCV-2, 1 de cada 10 cerdos manifiestan entidad clínica. Los cerdos asintomáticos desarrollan una efectiva inmunidad humoral y celular que producirá una baja carga viral o la eliminación del virus. La respuesta inmune adaptativa aparece a las 3 semanas post-infección a través de los anticuerpos neutralizantes contra epítopes de la cápsula viral (Kekarainen y col., 2015). La detección de anticuerpos neutralizantes 3 semanas post-exposición al virus es la medición más importante para evaluar la protección y su no presencia indicaría la incapacidad de eliminar el virus.

Dentro de PCV-AD, la presentación sistémica de mayor prevalencia e impacto económico a nivel mundial es el SMAP. Es una enfermedad multifactorial, en la que la infección por PCV-2 por sí solo no induce SMAP, se requiere de la coinfección por otros virus en particular Torque Teno Virus en porcinos 1 y 2 (TTV 1 y 2) (Teixeira y col., 2015; Nieto y col., 2015).

Siendo el cerdo su hospedador natural. La ruta oro-nasal y la vía vertical de la madre a la prole son las vías predominantes de exposición al virus, siendo muy eficiente la transmisión horizontal entre los cerdos. Se ha reproducido experimentalmente por esta vía, tanto la infección como la enfermedad. La transmisión vertical de PCV-2 también ha sido documentada demostrándose la transmisión transplacentaria del virus (Segalés y col., 2012).

Afecta a cerdos de 6 y 15 semanas de edad (Ambroggi y col, 2005; Segalés y col. 2005). La morbilidad es de 4-30% y mortalidad 4-20% (Segalés y Domingo., 2002). Se caracteriza por pérdida de peso, palidez de la piel, distrés respiratorio, diarrea y ocasionalmente ictericia. Entre los hallazgos anatomopatológicos más importantes se encuentra la linfadenomegalia generalizada. Los pulmones se pueden encontrar edematosos, no colapsados y de consistencia firme. El hígado puede encontrarse agrandado y en la corteza renal pueden hallarse focos blanco grisáceos (riñón a manchas blancas) (Rosell y col., 1999).

En la infección subclínica (IS-PCV-2) se observa menor ganancia diaria de peso (GDP), ausencia de signos clínicos, ausencia de lesiones macroscópicas, sin lesiones histológicas o bien leves en tejido linfoide, caracterizadas por una despoblación linfoidea, y asociada a una baja carga viral en los tejidos. En infecciones subclínicas se sugiere realizar técnicas de PCR para poder detectar PCV-2 (Segalés y col. 2014).

Otras presentaciones incluyen:

- Cuadros reproductivos (ER-PCV-2). La presentación clínica más común es el incremento de fetos momificados y natimortos durante el parto. La manifestación clínica de la infección por PCV-2 en la cerda es muy variable, por lo tanto la

infección por PCV-2 debe estar incluida en el diagnóstico diferencial de cualquier problema reproductivo (Krakowa y col. 2009; Chae, 2005).

- Síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (SDNP). Puede afectar tanto a cerdos de desarrollo y engorde, aunque su prevalencia es muy baja (Segalés y col. 1998). Esta presentación ha sido descrita en nuestro país (Machuca y col., 2000). La lesión característica del SDNP es una vasculitis necrotizante sistémica que afecta principalmente piel y riñón (Insarralde y col., 2010). Los animales afectados gravemente (especialmente a nivel de riñón) suelen morir a los pocos días después de la aparición de los signos clínicos. (Segalés y col. 2014). A pesar de que existe una serie de circunstancias que asocian al PCV-2 con el SDNP, todavía no se establecido una relación causal entre el agente y la enfermedad. Desde que se usan masivamente las vacunas frente a PCV-2, la prevalencia del SDNP ha disminuido hasta niveles prácticamente indetectables.
- Enfermedad pulmonar (EP-PCV-2) y enfermedad entérica (EE-PCV-2) (Cino-Ozuna y col. 2011; Segalés y col., 2012). Aunque en la bibliografía se suele incluir estas dos enfermedades dentro del grupo de las PCVAD, la sintomatología respiratoria y digestiva encontrada en estas enfermedades también puede estar presente en el SMAP (Opriessnig y col, 2007), diferenciándose mediante estudios histológicos e inmunohistoquímicos de pulmón, intestino y tejidos linfoides.

En la actualidad se controlan las PCV-AD clínicas mediante vacunación frente a PCV-2. Estas vacunas han logrado disminuir la signología clínica, la carga viral, las lesiones microscópicas, con el aumento de la GDP y del consumo alimentario (CA) pero la infección persiste en forma subclínica (Segalés y col. 2005). La mayoría de

los cerdos que se infectan, lo hacen de forma subclínica, traducándose en una menor GDP, esto se hace evidente cuando se comparan animales vacunados y no vacunados en granjas con infecciones subclínicas (Young y col. 2011).

El virus tiene gran capacidad de mutar semejante a un virus ARN y esta característica más el plus de la presión inmune por vacunación hace que aparezcan nuevos mutantes/variantes que diferirán en su patogenicidad. Como resultados de estos estudios se comprobó que las poblaciones de PCV-2 que circulan en las granjas son muy variables y esa diversidad varía en granjas vacunadas vs no vacunadas. Así mismo se ha reportado la presencia de ADN de PCV-2 en materia fecal de humanos, médula ósea de bovinos, roedores, muestras de agua, mosca doméstica y en mosquitos (Li y col., 2010, Zhai y col., 2014).

Debido a que la infección por PCV-2 es ubicua, el diagnóstico no se puede basar solamente en la detección del agente o de los animales seropositivos.

El diagnóstico de las enfermedades asociadas a PCV-2 debe estar basado en tres criterios básicos: presencia de signos clínicos, presencia de lesiones compatibles con PCV-2 con detección del virus dentro de estas lesiones (Segalés y col., 2005) y detección del virus o su genoma mediante técnicas de hibridación, IHQ o qPCR de los tejidos. Si bien existe una clara correlación entre la cantidad de PCV-2 observada en tejidos y la gravedad de las lesiones linfoides microscópicas en SMAP, la diferencia principal entre animales con infección clínica y subclínica es la carga viral por gramo de tejido de PCV-2 en los mismos.

Las técnicas de qPCR permiten la cuantificación del PCV-2 en tejidos y/o suero siendo muy utilizadas en el diagnóstico de dicha enfermedad. Estas técnicas son útiles a nivel poblacional pero no a nivel individual por su alto costo, es por eso

que se deben combinar criterios clínico-patológicos para llegar al diagnóstico de la infección producida por PCV-2 (Olvera y col., 2004). Aunque se ha trabajado bastante con técnicas serológicas para la detección de anticuerpos a PCV-2 (Segalés y Domingo, 2002), con la implementación de la vacuna la gran mayoría de los animales son seropositivos, por lo tanto estos anticuerpos son de utilidad en la observación de la dinámica de anticuerpos frente a PCV-2 durante el seguimiento de un programa vacunal, en el desarrollo de estudios epidemiológicos y en la evaluación de la interferencia de la inmunidad materna con la vacunación (Fort y col., 2009).

Desde el 2007, se vienen utilizando con éxito vacunas comerciales en granjas de todo el mundo (Kekarainen y col., 2010). La utilización masiva de estas vacunas ha contribuido al control del desarrollo de la enfermedad clínica, hasta el punto en que hoy en día estos casos se presentan en contadas ocasiones. A pesar de ello, la infección subclínica por PCV-2 es habitual en granjas comerciales y también se presentan nuevos casos en animales vacunados, compatibles con SMAP. En estos casos el veterinario clínico debe evaluar qué criterio diagnóstico utilizar en las granjas porcinas.

Las vacunas vigentes hoy en día son las siguientes: a) vacunas a subunidades (BI, MSD); b) vacuna PCV-1 con el ORF2 del PCV-2 (quimera inactivada) (Zoetis) y; c) vacuna con el virus entero inactivado (Merial). Todas reducen la carga viral, la replicación viral en órganos, la reducción de las lesiones de SMAP, la mortalidad, el descarte y el aumento GDP. Todas se basan en el genotipo PCV-2a.

Estudios recientes con una vacuna PCV-2b mostró ser más efectiva que la PCV-2a en coinfección con PCV-2a y PCV-2b; PRRS y parvovirus (Opriessing y col., 2013). En condiciones de campo los cerdos vacunados y con infección subclínica se mantienen infectados por PCV-2 y varían en su carga viral. Los macrófagos derivados de monocitos permanecen activos y son capaces de cumplir con su función. Sin embargo en cerdos con alta carga viral (sobreinfección) reducen su capacidad fagocítica y los hace más susceptibles a las infecciones bacterianas secundarias. En infecciones subclínicas la vacunación favorece un mayor peso a las 18 y 24 semanas así como un aumento de la GDP sin diferencias en la mortalidad. La vacunación de las hembras previo al servicio aumenta la tasa de parto, el número de lechones nacidos vivos, su peso a las 3 semanas así como el número de cerdos destetados.

En un futuro cercano se prevé el desarrollo de vacunas polivalentes contra los diferentes genotipos pero en la actualidad y en condiciones de campo todas las vacunas son efectivas para los subtipos PCV-2b y PCV-2d.

Objetivo General

- Estudiar, en distintos establecimientos de explotación porcina de la provincia de Buenos Aires, tanto en sistemas intensivos como semi-intensivos, la relación entre *M. suis* y la presencia de PCV-2.

Objetivos particulares**Sección 1**

- Evaluar mediante estudios hematológicos con distintas coloraciones la presencia de *M. suis*, así como la caracterización del tipo de anemia y/o alteraciones en las concentraciones bioquímicas sanguíneas.
 - ✓ Coloración de May Grünwald-Giemsa.
 - ✓ Coloración de Naranja de Acridina.

Sección 2

- Realizar estudios de PCR para la detección de *M. suis* en muestras de sangre.
 - ✓ Diseño de los primers *M. suis* especie-específico.
 - ✓ Estandarización de la técnica de PCR:
 - Diseño de primers universales para hemoplasmas.
 - Estudio experimental en cerdos para la obtención de controles positivos y negativos de *M. suis*.
 - ✓ Procesamiento de las muestras de las granjas involucradas en el estudio.

Sección 3

- Realizar estudios de PCR para la detección de PCV-2 en muestras de sangre y su relación con *M. suis*.
 - ✓ Diseño de los primers PCV-2 especie-específico.
 - ✓ Relación entre *M. suis* y PCV-2.

Sección 4

- Realizar estudios anatomopatológicos e inmunohistoquímicos de los animales seleccionados para el diagnóstico de infección por *M. suis* y PCV-2, en muestras de bazo y linfonódulos respectivamente.

Evaluación de la presencia de *M. suis* mediante estudios hematológicos con distintas coloraciones, caracterización del tipo de anemia y/o alteraciones en las concentraciones bioquímicas sanguíneas

1.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.- Características de los establecimientos sujetos a estudio

Se estudiaron 30 establecimientos, localizados en la provincia de Buenos Aires. Se elaboró una planilla ad hoc donde se registraron los datos productivos y sanitarios de cada una de las granjas en estudio, de acuerdo a los datos obtenidos en entrevistas personales con los médicos veterinarios asesores de dichas granjas y de los propios productores. Para ordenar los datos de las granjas se caracterizaron las variables como se explica a continuación:

Producción:

- Tipo de explotación: (1) Intensiva (GI), (2) Semi-intensiva (GSI).
- Ciclo: (1) un sitio, (2) dos sitios.
- Alimentación: (1) Producción propia; (2) comercial; (3) subproductos; (4) mixtas.
- Destino: (1) venta de lechones; (2) capones; (3) reposición de reproductores.
- Manejo reproductivo: (1) monta natural, (2) inseminación artificial.
- Plan sanitario con vacuna contra PCV-2: (1) SI, (2) NO.
- Asesoramiento veterinario: (1) SI, (2) NO.
- Antecedentes y/o signos clínicos de *M. suis*.: (1) SI, (2) NO.
- Antecedentes y/o signos clínicos de PCV2: (1) SI, (2) NO.

Instalaciones:

- Sistema de Ventilación
 - 1) Regular: ventilación abierta sin control en todas las salas.
 - 2) Buena: ventilación mediante tela mosquitera solo en sala de maternidad.
 - 3) Muy buena: ventilación mediante tela mosquitera, ventiladores de pared y control mediante sensores de temperatura y humedad de todas las salas.

Higiene:

- 1) Regular: se lavan las salas sin desinfección 1 vez por semana (el día de movimiento de animales de una sala a otra).
- 2) Buena: se lavan las salas y se desinfectan, el día de movimiento de animales de una sala a otra.
- 3) Muy buena: Ídem anterior. Además control de vectores hematófagos y roedores.

1.2.- Animales utilizados en el estudio

El estudio de este trabajo se realizó de acuerdo a la accesibilidad de cada granja, según manejo interno. Para realizar el muestreo el criterio de selección se basó en elegir animales al azar, en las categorías de: maternidad (desde el primer día de vida al destete 21 ± 7 días de vida); recría (desde el destete 21 ± 7 días hasta los 70 ± 7 días de vida); desarrollo (desde los 70 ± 7 días de vida hasta los 85 ± 2 días de vida); terminación (desde los 85 ± 2 días de vida hasta los 165 días de vida) y hembras reproductoras (primerizas y adultas hasta 4^{to} parto), con y sin signología clínica a *M. suis*. El número de animales por categoría, tanto de GI como GSI de la provincia de Buenos Aires se exponen en la Tabla1.

Tabla 1. Total de animales muestreados por categoría en GI y GSI.

Categorías	GI⁽¹⁾	GSI⁽²⁾
Maternidad (madres)	48	59
Maternidad (lechones)	99	14
Recría	99	42
Desarrollo	36	33
Terminación	20	32
Subtotal	302	180
Total		482

⁽¹⁾ granjas intensivas y ⁽²⁾ granjas semi-intensivas.

1.3.- Estudio hematológico

Se realizaron hemogramas de un total de 482 muestras de sangre de las categorías nombradas en la Tabla 1. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción de la vena cava craneal, utilizando agujas 18G x 2", 21G x 1" (según categoría de animal) y jeringas estériles de 5 ml. Se extrajo 1 ml de sangre con ácido etilen diamina tetracético (EDTA) como anticoagulante de elección, respetando la relación sangre/anticoagulante. Cada tubo fue identificado individualmente. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento dentro de las 24 h de su extracción.

Para el procesamiento de las muestras se utilizó un Contador Celular Semiautomático Sysmex F820, para realizar el hemograma. Con el mismo se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Hematocrito (%)
- Dosaje de la concentración de hemoglobina (g/dl)

- Recuento de eritrocitos ($10^6/\mu\text{l}$)
- Recuento de leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$)
- Índices hematimétricos: volumen corpuscular medio (VCM); hemoglobina corpuscular media (HbCM) y concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHbC)
- Recuento de Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$)

Todos los valores de hematocrito realizados con el contador celular se corroboraron manualmente en una microcentrífuga como control de calidad de rutina. También se midieron los sólidos totales a través de un refractómetro. Por último se realizó el frotis sanguíneo para la obtención de la fórmula leucocitaria relativa (FLR), en la cual se expresa en porcentaje el resultado obtenido de cada leucocito (neutrófilos en banda, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos), observando cien células y también se calculó la fórmula leucocitaria absoluta (FLA), matemáticamente a partir de la relación entre el porcentaje de cada tipo de leucocito de la FLR y el recuento total de GB expresada en microlitros. Además se observó la presencia de alteraciones morfológicas de las células sanguíneas y la presencia o ausencia de *M. suis*.

1.3.1.- Realización de los frotis sanguíneos

Se realizaron en todas las muestras procesadas, por duplicado y fueron teñidas con MGG. A efecto de realizar la comparación de las dos coloraciones: A) MGG y B) NA, se utilizaron 100 frotis sanguíneos al azar para la identificación de *M. suis*.

A) Coloración de MGG

Los extendidos sanguíneos fueron teñidos con MGG, debido a que es la técnica de elección que se utiliza en hematología.

Técnica: coloración de MGG.

A los frotis secos previamente rotulados, se los cubrió con el colorante de May Grünwald (Merk®) durante 5 min. Luego se les agregó solución buffer (pH 7,5) sin lavar el colorante anterior por 5 min más. Pasado ese tiempo se lavó con agua de la canilla y se cubrieron con el colorante Giemsa (Merk®) diluido (por cada ml de buffer 2 gotas de Giemsa), durante 20 min. Por último se lavaron y dejaron secar a temperatura ambiente hasta su lectura. Todos los frotis fueron observados con un microscopio Nikon ECLIPSE E400, a (1000X).

B) Coloración NA

Inicialmente se realizó la coloración de acuerdo al protocolo de Darzynkiewicz (Criswell y col., 1998).

Técnica: coloración de NA.

Solución A: 0,1 ml tritón X-100 (Sigma®); 8 ml 1.0 M HCl; 0,877 g NaCl y agua destilada hasta llegar a un volumen final de 100ml y solución B: 37 ml 0.1 M ácido cítrico; 63 ml 0.2 M Na_2HPO_4 (pH 6.0); 0,877 g NaCl; 34 mg EDTA sal disódica y 0,6 ml NA (naranja de acridina 1 mg/ml). Fueron refrigeradas hasta su uso y protegidas de la luz.

Una vez preparadas las soluciones, se homogeneizaron en un tubo khan (siempre protegido de la luz), 400 μl solución A + 1,2 ml solución B y 300 μl de

sangre. Y se incubaron a 4°C durante 30 min. Luego se realizaron frotis con esta solución final y se dejaron secar hasta su observación.

Como no se obtuvieron buenos resultados en la observación de frotis en primera instancia con este protocolo, se realizaron algunas modificaciones de los siguientes parámetros antes de la comparación con MGG:

- 1) tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra de sangre hasta el procesamiento: menor a 2 h; 6 h; 12 h y 24 h.
- 2) fijación de los frotis: con metanol o sin metanol
- 3) modo, tiempo y temperatura de incubación en oscuridad de las soluciones para la coloración:
 - coloración sobre extendidos sanguíneos a 21°C; 4°C y 37°C y durante 30 min; 1 h; 6 h; 12 h y 24 h.
 - coloración en tubos khan a 21°C; 4°C y 37°C y durante 30 min; 1 h; 6 h; 12 h y 24 h.

Todos los frotis teñidos con la coloración de NA fueron observados mediante un microscopio de Epifluorescencia Olympus BH-2.

1.3.2.- Determinación del porcentaje de reticulocitos corregido

En todas las categorías de cerdos en donde el valor de hematocrito se encontró por debajo del valor de referencia se realizó el recuento de reticulocitos mediante la técnica del campo al décimo con la coloración de Azul Brillante de Cresil y el resultado se expresó como porcentaje de reticulocitos corregido (PRC). El

mismo se utilizó para evaluar la capacidad de regeneración medular y clasificar a las anemias en regenerativas cuando el valor de PRC era mayor a 2% y no regenerativas cuando era menor a 2% (Gaunt, 2000).

Técnica: coloración Azul Brillante de Cresil.

Se realizó una dilución en un tubo utilizando partes iguales de sangre con EDTA y colorante Azul Brillante de Cresil; se homogeneizó y se incubó 40 min en baño térmico (BT), a 37°C, luego se realizaron extendidos sobre portaobjetos de cada una de las muestras. Los extendidos se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron con metanol durante 15 min, se lavaron, luego se agregó el colorante Giemsa en solución al 2‰ durante 20 min. Por último se lavaron y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se observaron en microscopio óptico Nikon ECLIPSE E400 a (1000X).

1.4.- Estudios bioquímicos

Las muestras de sangre sin anticoagulante provenientes de los animales involucrados en el estudio, se colocaron en BT a 37°C durante 15 min y luego se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm. Una vez separados los sueros se colocaron en tubos eppendorf, por duplicado (uno para el análisis de las determinaciones bioquímicas y otro tubo para el diagnóstico de PCV-2). Se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

Para evaluar el estado de salud de los animales se midió la concentración de diferentes parámetros bioquímicos, utilizando los siguientes métodos: glucosa, (glucosa oxidasa/peroxidasa); urea, (Berthelot modificado); creatinina, (Jaffe-cinética); aspartato aminotransferasa (AST-GOT) y gama glutamil transferasa (GGT),

(IFCC-UV); fosfatasa alcalina (FAL), (Colorimétrico optimizado); proteínas totales, (Biuret); albúmina, (Bromocresolftaleína); globulinas, relación A/G (Cálculo matemático); bilirrubina total y directa, (Ácido sulfanílico diazotado).

Para el procesamiento, se utilizaron reactivos de Lab. Wiener®/ Lab. Biosystems® y un espectrofotómetro Metrolab Plus 1600. Los resultados se expresaron siguiendo las normas vigentes en bioquímica clínica (Kaneko, 1997).

1.5.- Análisis estadístico

Se realizó un análisis exploratorio de los datos (ADE) recolectados de las planillas ad hoc y de los resultados obtenidos con las técnicas de laboratorio. Estos análisis se realizaron mediante software de dominio público: EpiInfo™ 3.5.1 (CDC), Epidat versión 4.0 (OPS, Xunta de Galicia).

2.- RESULTADOS

2.1.- Características de los establecimientos sujetos a estudio

De los 30 establecimientos involucrados en este estudio el 63% (19/30) eran GI y el 37% eran (11/30) a GSI. Los resultados de los datos productivos fueron los siguientes:

Datos productivos:

- En las GI el 100% eran de un solo sitio, tenían una alimentación con producción propia y su destino era: el 97% para producción de capones y 3% de reposición de reproductores.

- En las GSI el 100% eran de dos sitios, alimentación comercial el 48% y alimentación mixta 52% y su destino el 98% para venta de capones y el 2% para venta de lechones.
- En ambos tipo de granja se contaba con asesoramiento veterinario y el manejo reproductivo era por inseminación artificial, salvo un 2% en GSI, que era por monta natural.
- En las GI y GSI el 76,8% y el 68,4% respectivamente tenía incluido en el plan sanitario vacuna contra PCV-2.
- El 10% de las GI y las GSI presentaban antecedentes y/o signos clínicos a *M. suis*. Las categorías afectadas fueron lechones y recría en los dos tipos de explotaciones. Los signos observados en estas categorías fueron: anorexia, mucosas pálidas y menor GDP al destete (Figura 1). En el 4% de la categoría de lechones se observó ictericia marcada que luego se corroboró con el análisis bioquímico de las muestras.



Figura 1. Lechón de 5 días de vida con mucosas pálidas.

- El 20% de las granjas presentaban antecedentes y/o signos clínicos de PCV-2. En este caso la categoría más afectada fue la recría, que presentaba anorexia,

decaimiento, dificultad respiratoria y retraso en el crecimiento como signos clínicos relevantes.

Instalaciones:

- El 100% de las GI presentaban un buen sistema de ventilación y un elevado nivel de higiene. Las GSI por su parte, presentaban un sistema de ventilación bueno en el 80% de las mismas y el restante 20% de nivel regular mientras que la higiene fue clasificada como buena en el 70% y regular en el restante 30% de la misma.

2.2.- Animales utilizados en el estudio

La categoría y número de animales empleados en este estudio se describe en la Tabla 1., en el punto 1.2.

2.3.- Estudio hematológico

A partir de los resultados obtenidos en el análisis hematológico de los animales pertenecientes a ambos tipos de explotaciones porcinas, se observó que el 59,7% (288/482) de los animales presentaban anemias (Tabla 2). Es decir el hematocrito por debajo del valor de referencia según categoría de animal. En estos animales se identificaron dos grupos, un 47,9% (231/482) con anemia leve (con un valor de hematocrito entre 27% y 37%) y el otro grupo 11,8% (57/482) con anemia severa (con un valor de hematocrito menor a 27%).

Entre los animales que presentaron anemia leve, el 17,8% correspondió a lechones, 10% madres, 14,1% recría y 6% desarrollo-terminación. En los mismos el promedio de hemoglobina fue de 9,7 g/dl, el recuento de GR $5 \times 10^6/\mu\text{l}$ y el recuento de plaquetas de $300 \times 10^3/\mu\text{l}$. Los ST dieron en promedio de 6-6,7 g/dl. Tanto las FLR

como FLA mostraron resultados normales según los valores de referencia para las categorías de animales. Además en los frotis sanguíneos se observaron eritrocitos normocíticos-normocromicos.

El segundo grupo, con una anemia severa, afectó solo a las siguientes categorías: 1,45% madres, 7,8% lechones y 2,5% recría. En estos animales el promedio de hemoglobina fue de 7 g/dl, el recuento de GR de $3 \times 10^6/\mu\text{l}$ y el recuento de plaquetas de $460 \times 10^3/\mu\text{l}$. Los ST dieron en promedio de 7,7-8 g/dl. Tanto las FLR como FLA mostraron resultados normales según los valores de referencia para las categorías de animales. Además en los frotis sanguíneos se observaron alteraciones morfológicas como: células en diana, crenocitos, anisocitosis, poiquilocitosis y policromasia.

Con respecto a la identificación de *M. suis* en los frotis sanguíneos teñidos con MGG, se observaron formas coco-bacilares sobre la superficie de los eritrocitos o libres entre ellos, tanto en animales con y sin anemia, provenientes de ambos tipos de explotaciones. Los resultados son expresados en la Tabla 2.

Tabla 2. Total de animales anémicos y no anémicos en GI y GSI, positivos y negativos a *M. suis* coloreados con MGG.

GI⁽¹⁾ y GSI⁽²⁾	<i>M. suis</i> (+)	<i>M. suis</i> (-)	Total
Anémicos	97 (20,1%)	191 (39,6%)	288
No anémicos	67 (13,9%)	127 (26,3%)	194
Total	164	318	482

⁽¹⁾granjas intensivas y ⁽²⁾ granjas semi-intensivas.

2.3.1.- Comparación de las coloraciones de MGG y NA en frotis sanguíneos

Para la tinción de NA la técnica optimizada elegida para la comparación fue la siguiente: tiempo de extracción de la muestra hasta su procesamiento menor a 6 h, frotis sanguíneo fijado con metanol, preparación de las soluciones para la coloración en tubos khan a 37°C durante 1 h.

El resultado de la comparación de las dos coloraciones en los 100 frotis observados fue el siguiente:

En la coloración de MGG se observó un 38% de animales positivos a *M suis*. Mientras que en la coloración de NA se observó un 16% de animales positivos a *M. suis*.

En las siguientes fotos se muestran frotis teñidos con las diferentes coloraciones, la presencia de micoplasmas y las alteraciones morfológicas en los eritrocitos (Figuras 2 a 6).

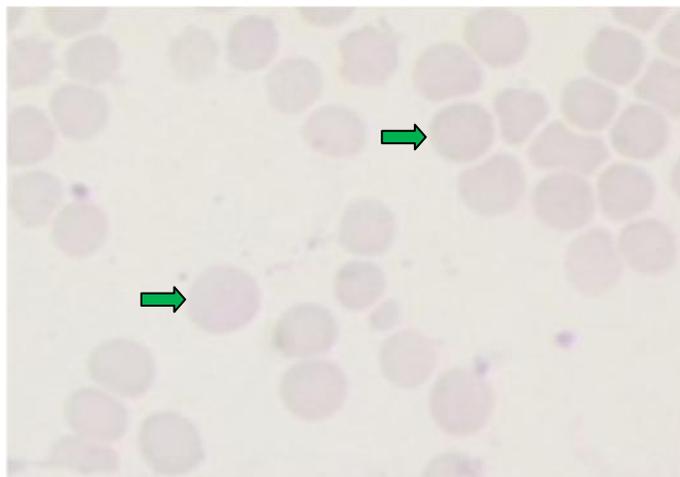


Figura 2. Eritrocitos normales de una muestra de porcino teñido con MGG (indicados con flechas verdes) (1000X).

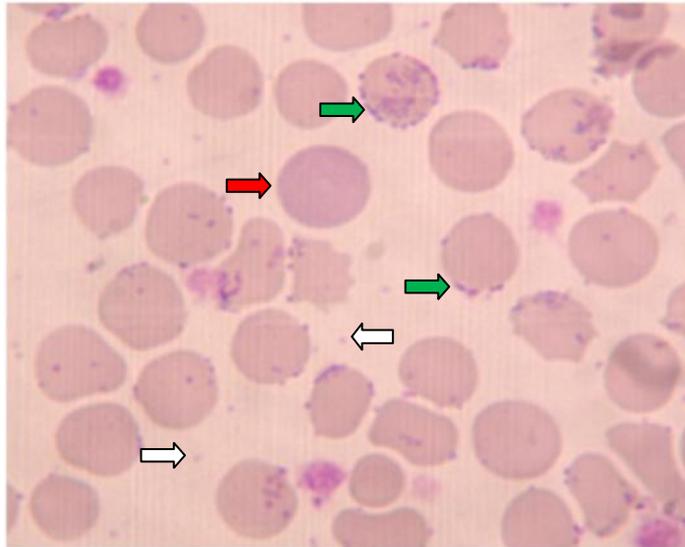


Figura 3. Frotis teñido con MGG de una muestra de porcino. Presencia de cocos-bacilos libres en el plasma (flechas blancas) y en la superficie de los eritrocitos compatibles con *M. suis* (flechas verdes). Presencia de policromasia (flecha roja) (1000X).

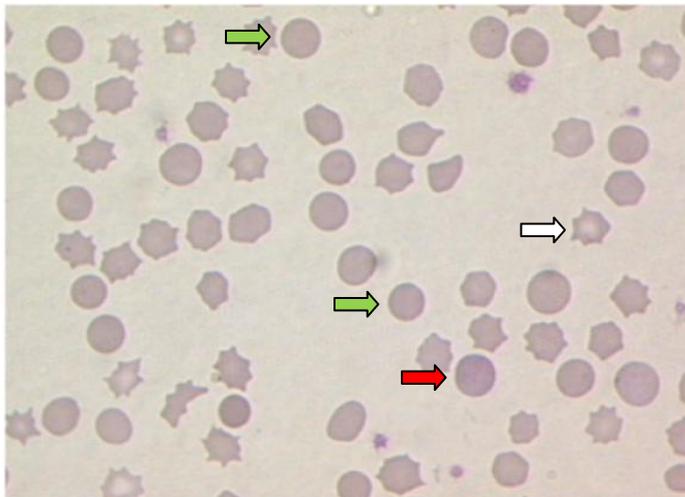


Figura 4. Frotis teñido con MGG de una muestra de porcino con alteraciones en los eritrocitos. Presencia de anisocitosis (flechas verdes), crenocitos (flecha blanca) y policromasia (flecha roja) (1000X).

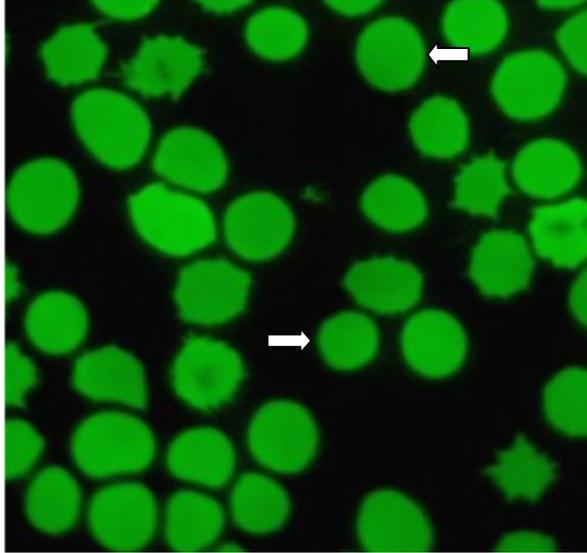


Figura 5. Eritrocitos normales de una muestra de porcino teñidos con NA (flechas blancas) (1000X).

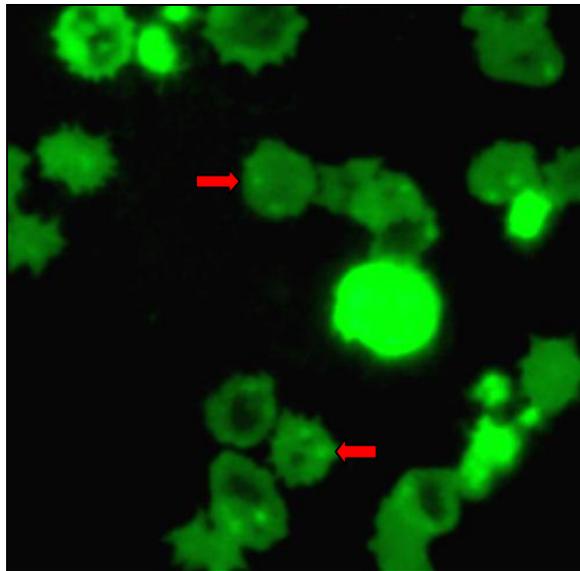


Figura 6. Frotis teñido con NA de una muestra de porcino. Se observan pequeñas partículas fluorescentes adheridas a la superficie de los eritrocitos (flechas rojas) (1000X).

2.3.2.- Resultados de la determinación del porcentaje de reticulocitos corregido

De los 288 animales anémicos, en el grupo con anemia leve (231) el resultado de PRC fue en promedio del 2-3% y en el grupo con anemia severa (57) el PRC fue en promedio del 3,7-4% (Figura 7).

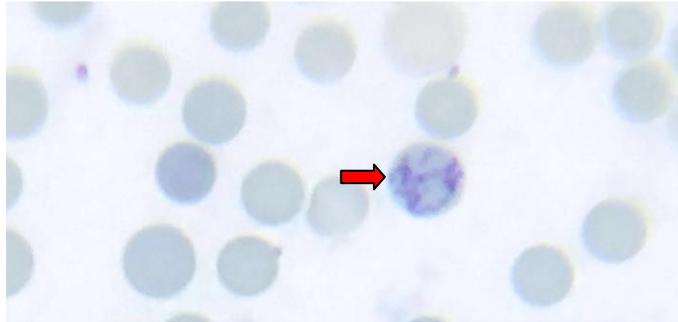


Figura 7. Reticulocito de una muestra de porcino teñido con Azul Brillante de Cresil (flecha roja) (1000X)

2.4.- Resultados de los estudios bioquímicos

Los valores promedio de los parámetros bioquímicos de las 482 muestras incluidas en este estudio se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Determinaciones bioquímicas realizadas en las diferentes categorías de animales en GI y GSI, positivas y negativas a *M. suis* con MGG.

En GI y GSI	Lechón		Madres		Recría		Desarrollo		Terminación	
	(+) ⁽¹⁾	(-) ⁽²⁾	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Glucemia (mg/dl) V.R. ⁽³⁾ : 85-150	70	75	80	90	90	87	70	79	84	90
Urea (mg/dl) V.R.: 10-30	20	22	30	34	20	26	30	27	30	30
Creatinina (mg/dl) V.R.: 1-2,7	0,7	0,8	1	0,9	0,8	1	1,1	1	1,2	1,5
GOT-AST (UI/L) V.R.: 32-84	20	25	30	40	20	30	27	38	29	27
GGT (UI/L) V.R.: < 18	10	7	15	14	11	10	12	11	16	10
FAL (UI/L) V.R.: < 395	--	--	130	100	--	--	--	--	80	93
Proteínas T. (g/dl) V.R.: 7,9-8,9	5,8	5,6	7,3	7,2	5,9	5,4	6	7	7,3	6,5
Albúmina (g/dl) V.R.: 1,8-3,3	2,3	2,4	3,5	3	2,9	3,2	2,6	3,4	3,1	2,5
Globulinas (g/dl) V.R.: 5,6-6,1	3,5	3,2	3,8	4,2	3	2,2	3,4	3,6	4,2	4
Relación A/G.	0,65	0,75	0,92	0,71	0,97	1,45	0,76	0,94	0,74	0,63

⁽¹⁾muestras positivas a *M. suis*, ⁽²⁾muestras negativas a *M. suis* y ⁽³⁾valor de referencia

En la categoría lechones con anemia severa, se observó un 4% de animales con hiperbilirrubinemia (Fig. 8), el resto de los animales y de las distintas categorías no se observaron valores por fuera de los rangos de referencia (Kaneko, 1997).



Figura 8. Lechón de 25 días de vida con ictericia y retraso en el crecimiento (Der.).

3.- DISCUSIÓN

Los mecanismos por los cuales *M. suis* se transmite de animal a animal son aun en parte desconocidos, aunque se sabe que se transmite en forma directa con sangre infectada con esta bacteria, mediante el uso de instrumental contaminado, vectores hematófagos y vía transplacentaria (Henry y col., 1979; Arauz y col., 2002; Song y col., 2014). De forma indirecta puede transmitirse mediante saliva, secreciones nasales y vaginales, orina, alimento y agua contaminada (Dietz y col., 2014). También se conoce la existencia de ciertos factores de riesgo que deben ser tenidos en cuenta como por ejemplo la higiene regular en las instalaciones, presencia de vectores, sobrepoblación de animales por corral, etc. (Song y col., 2012).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el relevamiento realizado en las granjas involucradas en el estudio, cabe destacar como factor hallado en la diseminación de la infección la insuficiente ventilación e higiene de las salas en las GSI que fue calificado como regular. Esto puede favorecer la presencia de roedores

y vectores hematófagos así como la coinfección de otros animales domésticos dentro del predio del establecimiento, coincidiendo con lo publicado por otros autores (Song y col., 2013; Hornok y col., 2011; Song y col., 2014).

Los signos clínicos observados en otros trabajos fueron descritos en animales infectados experimentalmente, observándose una presentación aguda con fiebre, debilidad, anemia, cianosis con necrosis periférica en el extremo de las orejas, coagulopatías, trombosis vascular y diátesis hemorrágica y en su presentación crónica con infecciones intercurrentes, anemia en lechones de maternidad, retraso en el crecimiento en recría y engorde. En cambio en nuestro trabajo la observación de signos clínicos se realizó sobre animales infectados en forma natural, por lo que no hubo una observación discriminada de la forma aguda y crónica. Estos signos fueron: anorexia, presencia de mucosas pálidas y menor GDP al destete coincidiendo con trabajos publicados (Messick col., 2004; Do Nascimento y col., 2014; Hoelzle y col., 2014; Stadler y col., 2014). El signo predominante fue la anemia encontrándose en el 59,7% de los animales en estudio. Siendo los lechones los más afectados, presentando una anemia severa. Luego siguieron en importancia las categorías de recría y de madres, presentando una anemia leve. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Machuca y col., (1999) y difieren de lo publicado por Pereyra que menciona como las categorías más afectadas a recría y desarrollo (Pereyra, 2016).

Stadler y col., (2014) encontraron en animales infectados experimentalmente no esplenectomizados, valores de hematocrito bajo con disminución de la hemoglobina menor a 8 g/dl y del recuento de GR $4,7 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Oehlerking y col., 2011; Felder y col., 2011). En nuestro estudio obtuvimos resultados similares solo en

el 11,8% de los animales infectados naturalmente, con un valor de hematocrito menor a 27%, hemoglobina menor a 7 g/dl y del recuento de GR $3,38 \times 10^6/\mu\text{l}$.

La medición de la capacidad de regeneración de la medula ósea a través de PRC en esta enfermedad no fue incluida en el diseño de los trabajos realizados por otros autores hasta el momento. En nuestros resultados se observó una anemia regenerativa de origen hemolítico por la presencia de *M. suis*.

En los frotis sanguíneos de estos animales con anemia severa, utilizando la coloración de MGG se observaron alteraciones típicas de una anemia regenerativa, característica de las infecciones producidas por *M. suis*, como anisocitosis, poiquilocitosis, policromasia, células en diana, crenocitos y presencia de los microorganismos adheridos a la membrana de los eritrocitos coincidiendo con otros autores (Messick, 2004; Hoelzle y col., 2014).

En los animales que presentaron una anemia leve se observaron en los frotis normocitosis, normocromía y presencia de escasa cantidad de microorganismos adheridos a los GR. Estos hallazgos indican la presencia de una anemia crónica compensada que podría sugerir una infección subclínica. Condición que podría predisponer a ingreso de coinfecciones, probablemente debido a la supresión de las funciones de los linfocitos T (Anziani y col., 1986; Gresham y col., 1996; Henderson y col., 1997; Zachary y col., 1985; Hoelzle y col., 2014; Messick, 2004).

Do Nascimento y col., (2013) y Do Nascimento y col., (2014) observaron en sus estudios la presencia de cocos-bacilos infectando pocos eritrocitos y la ausencia de signos clínicos en animales infectados experimentalmente esplenectomizados. En nuestro trabajo coincidimos con lo mencionado por este autor, donde observamos un 13% de animales con ausencia de signos, los cuales presentaron formas coco-

bacilares sobre la superficie de los eritrocitos pero en animales infectados naturalmente.

En cuanto a la utilización de las diferentes coloraciones sobre frotis sanguíneos Heinritzi y col., (2000); Criswell y col., (1998) y Hoelzle y col., (2003), sugerían que la técnica ideal elegida para identificar *M. suis* era la coloración de NA. Sin embargo trabajos reportados por Ritzman y col., (2009), observaron una baja sensibilidad diagnóstica con esta coloración. A partir de los resultados obtenidos en la comparación de la coloración entre las dos técnicas (MGG y NA) realizadas en nuestro estudio estamos en condiciones de refutar que esta técnica es la ideal y coincidimos con lo mencionado por este último autor. Ya que se demostró un mayor porcentaje en el diagnóstico positivo a *M. suis* utilizando la coloración de MGG con respecto al NA.

Stadler y col., (2014) en sus estudios hematológicos realizados en animales infectados en forma experimental esplenectomizados y no esplenectomizados utilizó la coloración de MGG como complementaria en el diagnóstico de la caracterización de la anemia. Los hallazgos hematológicos obtenidos en nuestro estudio coinciden con el autor mencionado, debido que no solo se obtuvo información de la presencia del microorganismo, sino que además brindó información sobre las alteraciones morfológicas que nos permitieron clasificar el tipo de anemia. Esto no sucedió con la coloración de NA, ya que solo nos informó sobre la presencia o no de la bacteria con un menor porcentaje de sensibilidad. Se debe mencionar que ambas técnicas son de baja sensibilidad, ya que solo son visibles los microorganismos cuando hay una carga bacteriana importante en sangre periférica, y subjetivas por ser muy dependientes de la experiencia del operador. También es importante aclarar que la

coloración de MGG tiene la ventaja de ser una técnica de bajo costo y relativamente sencilla comparada con el NA que es de alto costo, porque se necesita de un microscopio de Epifluorescencia y además, un área especial de laboratorio para la preparación y desarrollo de la técnica, debido que el NA es un agente químico con propiedades mutagénicas.

En los resultados de las determinaciones bioquímicas analizadas, algunos autores mencionan en sus trabajos, en animales de experimentación la presencia de hipoglucemia, (Nonaka y col., 1996; Hoelzle y col., 2014; Guimaraes y col., 2011a). En nuestro trabajo en animales infectados naturalmente la glucemia se mantuvo normal en todas las categorías, el único cambio presentado fue hiperbilirrubinemia solo en un 4% de lechones con anemia severa. En el resto de las categorías este metabolito se mantuvo dentro de los rangos de referencia (Kaneko, 1997). Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Hoelzle y col., (2014) y Stadler y col, (2014), en el curso agudo de la enfermedad en animales infectados experimentalmente.

4.- CONCLUSIONES

- Se debe hacer hincapié en las medidas de prevención y trabajar con buenas prácticas de manejo en las granjas porcinas a efectos de disminuir los factores de riesgo, para la diseminación de la enfermedad. Un ejemplo de ello es mejorar el sistema de ventilación de las salas y la frecuencia de limpieza de las mismas. Otro sería implementar programas de desinfección de roedores y vectores hematófagos debido que varios estudios sugieren que *M. suis* es un potencial agente zoonótico.

- Los signos clínicos observados en los animales infectados naturalmente fueron: anemia (severa principalmente en lechones y anemia leve en las otras categorías), anorexia, decaimiento y retraso en el crecimiento.
- Debido a que a los estudios hematológicos brindan información sobre la presencia o no de la bacteria como también de las alteraciones en la morfología celular sanguínea, se sugiere implementar estos en forma rutinaria como herramienta diagnóstica de bajo costo, en granjas con antecedentes a *M. suis*. Estos datos junto con la signología clínica permiten tomar medidas preventivas y/o de tratamiento en las granjas.
- Tanto la coloración de MGG como la de NA presentan una baja sensibilidad, (dependiendo de la recolección y acondicionamiento de la muestra, de la carga bacteriana y de la experiencia del operador). A pesar de lo mencionado, en base a los resultados obtenidos se sugiere el uso de la coloración de MGG.
- Sólo se observó hiperbilirrubinemia en el 4% de lechones con anemia severa de animales infectados naturalmente. No encontrando alteraciones en el resto de las determinaciones bioquímicas realizadas en todas las categorías.

Estudios de PCR para la detección de *M. suis* en muestras de sangre

En nuestro país en el año 2010, cuando se comenzó a incursionar en técnicas de biología molecular para el diagnóstico de *M. suis*, había muy poca información sobre el tema. El único autor que utilizó PCR en el diagnóstico de esta especie fue Pereyra y col., (2004) pero sus muestras se analizaron en Estados Unidos en el laboratorio de Messick y col, con la técnica publicada por estos investigadores (1999), no habiéndose desarrollado hasta el momento una técnica diagnóstica en Argentina.

En un comienzo se trabajó con los protocolos publicados por Messick y col., (1999) y Hoelzle y col., (2003). Se utilizaron los primers de la Tabla 4, ensayándose diferentes combinaciones de los siguientes parámetros: duración de los ciclos, número de ciclos, gradientes de temperatura, diferentes marcas de Taq y distintos cicladores, con 64 muestras de sangre de cerdos provenientes de granjas positivas a *M. suis*, evaluadas mediante frotis sanguíneos y 4 controles positivos y 3 negativos previamente corroborados por PCR (cedidos por la Dra. Pereyra N. del Instituto de Porcinotecnia, Ministerio de la Producción de la provincia de Santa Fe, Argentina).

Debido a que las amplificaciones utilizando los protocolos de los autores mencionados no tuvieron la sensibilidad ni repetitividad reportada y teniendo en cuenta que en el año 2011 se obtuvieron las secuencias completas del genoma de dos cepas (Oehlerking y col., 2011; Messick y col., 2011), además de otras tantas secuencias disponibles, se diseñó una nueva PCR específica para *M. suis*.

Tabla 4. Primers utilizados para la optimización de la técnica de PCR.

Autores	Primers	Tamaño⁽¹⁾
Hoelzle, 2003	MSU1,(5'-GCATTGCCAGTCCCCAAGGA-3')	782 bp
	MSU2,(5'-TGCGGGGAGTACGTGGGAAGG-3')	
Messick, 1999	<i>E. suis</i> f2,(5'-GCTTAACAAGTGTTTCGCGGT-3')	839 bp
	<i>E. suis</i> r2,(5'-CTTAECTCAATCAAATTACC-3')	

⁽¹⁾Tamaño esperado del producto amplificado.

1.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.- Diseño de primers específicos para *M. suis*

Para el diseño de los primers se utilizaron las secuencias del gen ribosomal 16S disponibles en GenBank de los micoplasmas hemotróficos (*M. coccoides*, *M. haemocanis*, *M. haemofelis*, *M. haemomuris*, *M. ovis*, *M. wenyonii*, “*Candidatus M. haemominutum*”, “*Candidatus M. haemoparvum*” y “*Candidatus M. turicensis*” incluyendo los genomas de las cepas *M. suis* KI3806 y *M. suis* str. Illinois). Para cada especie se realizó un alineamiento múltiple utilizando el software ClustalX 2.1 (Larkin y col., 2007). Para cada uno de ellos se creó una secuencia consenso con un umbral de inclusión del 100% utilizando el programa BioEdit (Hall y col., 1999) de modo que las secuencias consenso muestren todas y cada una de las variantes posibles y no a la más frecuente. Las posiciones de los alineamientos en las que las secuencias presentaron variabilidad de nucleótidos se representaron en el consenso con la simbología para ambigüedad de bases recomendada por la IUPAC (Tabla 5).

Posteriormente se alinearon los consensos de cada especie con el ClustalX 2.1. Los alineamientos se muestran en el anexo 1. En éste último alineamiento se

buscaron regiones únicas para *M. suis* que se utilizaron para diseñar dos pares de primers directos y dos reversos, con el objeto de utilizarlos en una PCR anidada, mediante el programa Primer3 (Andreas Untergasser y col., 2007) (Tabla 6). Se incluyeron todas las variantes diseñando primers degenerados de modo que sea posible amplificar cualquiera de los posibles genotipos sin importar su frecuencia de aparición, con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica.

Tabla 5. Nomenclatura de nucleótidos.

Símbolos	Nucleótidos
M	A o C
R	A o G
W	A o T
S	C o G
Y	C o T
K	G o T
V	A o C o G
H	A o C o T
D	A o G o T
B	C o G o T
X	G o A o T o C
N	G o A o T o C

Referencia: *Cornish-Bowden (1985)*

Tabla 6. Primers *M. suis* especie-específico utilizados en la PCR anidada.

Autores	Primers	Tamaño⁽¹⁾
(Propios, 2011)	MSuisEP1f, (5'-AAWGGAGGCTGCCGMAAGGT-3') ⁽²⁾	443 bp
	MSuisEP1r, (5'-CACCGCGAACACTTGTTAAGCAARTA-3') ⁽²⁾	
	MSuis-EP2f, (5'-AGRTMGTTGGAGAGGTAADGGCT-3') ⁽³⁾	366 bp
	MSuis-EP2r, (5'-AYTTTTAACAAGKGRATACACAYTTCA-3') ⁽³⁾	

⁽¹⁾Tamaño esperado del producto amplificado, ⁽²⁾par externo y ⁽³⁾par interno.

1.2.- Estandarización de la técnica de PCR

1.2.1.- Diseño de primers universales para hemoplasmas

Se diseñaron primers universales para amplificar cualquier especie de micoplasmas hemotróficos. Se utilizaron las secuencias del GenBank de las especies relacionadas con *M. suis* que se pueden encontrar en las granjas porcinas. Estas son: “*Candidatus M. Haemominutum*” (felinos), “*Candidatus M. haemoparvum*” (caninos), *M. ovis* (ovinos), *M. wenyonii* (bovinos), *M. haemofelis* (felinos), *M. haemocanis* (caninos), *M. haemomuris* (ratas y ratones), “*Candidatus M. turicensis*” (felinos), *M. coccoides* (ratones), *M. parvum* (porcinos) y *M. suis* (porcinos). Para este diseño se trabajó con la misma metodología que para el diseño de los primers específicos de *M. suis*, explicada previamente, salvo que se buscaron regiones conservadas en las especies hemotróficas (Tabla 7).

Tabla 7. Primers universales de hemoplasmas utilizados en la PCR anidada.

Autores	Primers	Tamaño⁽¹⁾
(Propios, 2011)	MHemoEP1f,(5'- ATYCYTRCRGGAWGCAGCAG-3') ⁽²⁾ MHemoEP1r,(5'-GYGBGGACTACTGRGGTATC-3') ⁽²⁾	485 bp
	MHemoEP2f,(5'-GGRCGAAAGYCYGATGGAG-3') ⁽³⁾ MHemoEP2r,(5'-CTHCCCACRCTTTYVAGCC-3') ⁽³⁾	403 bp

⁽¹⁾Tamaño esperado del producto amplificado, ⁽²⁾par externo y ⁽³⁾par interno.

1.2.2.- Diseño experimental en cerdos para la obtención de controles positivos y negativos de *M. suis*

Para estandarizar la técnica de este ensayo se utilizaron controles cedidos por la Dra. Pereyra N., y luego se obtuvieron controles propios, a través del siguiente diseño.

Para ello se utilizó el modelo experimental de Groebel y col., (2009). Se trabajó con 4 hembras de 8,5 kg/p.v., de una granja con antecedentes a *M. suis* de la provincia de Buenos Aires. Las mismas fueron alojadas, alimentadas y controladas en los corrales de internación del Hospital Escuela de la FCV-UNLP, durante una semana para su adaptación. El trabajo experimental fue supervisado y aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCV-UNLP, Argentina (Res. 129/09).

Previo a la cirugía, se seleccionaron en base a estudios hematológicos y de PCR utilizando el protocolo de Pintos y col., (2013), 2 animales positivos y 2 negativos a *M. suis*. A los animales positivos se les realizó la esplenectomía total por la técnica de laparatomía abdominal media, utilizando anestesia inhalatoria. La premedicación y medicación utilizadas fueron las siguientes: sulfato de atropina 1%

0,04 mg/kg/p.v. IM; xilacina 2% 2mg/kg/p.v. IM; tiopental (inducción) EV; isoflurano (inhalatorio) y meloxicam 2% 0,4mg/kg/p.v. IM.

A los animales negativos se los dejó como controles. A las 4 hembras, se les realizó extracción de sangre post cirugía cada 48 horas para la realización de los estudios hematológicos, bioquímicos y de PCR, durante los 45 días que duró el trabajo experimental.

1.3.- Amplificación con los primers específicos de *M. suis* y primers universales para hemoplasmas

a) Extracción de ADN

Se utilizaron dos protocolos de extracción uno con óxido de sílice y el otro con DNAzol descritos en el anexo 2.

b) Reacción

La síntesis de ADN se realizó en un volumen final de 20 µl por reacción (Buffer 1X, dNTPs 0,25 mM, MgCl₂ 2 mM, primers 0,5 mM de cada uno, enzima FIREPol® Termoestable ADN Polimerasa (Solis, Biodyne) 0,5 U, agua bidestilada libre de nucleasas hasta completar un volumen final y 2 µl de ADN).

c) Ciclado

El programa de ciclado consistió en 2 min de desnaturalización a 92°C, 35 ciclos de: 30 seg de desnaturalización a 92°C, 30 seg de annealing a 45°C y 40 seg de elongación a 72°C, finalizando con 4 min de extensión a 72°C. Las PCRs anidadas tanto en *M. suis* como en hemoplasmas consistieron en dos rondas de amplificación, en la cuales en la primera se utilizaron 2 µl de ADN muestra y en la segunda ronda 1 µl de ADN de la primera ronda.

d) Análisis

Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

e) Secuenciación

Los productos amplificados fueron purificados con PEG según protocolo de Travis Glenn (www.mcdb.lsa.umich.edu/labs/olsen/files/PCR.pdf). (Anexo2)

Los productos purificados se secuenciaron en ambos sentidos en un Secuenciador Automático de ADN MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Las secuencias fueron comparadas y validadas utilizando el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1.4.- Muestras utilizadas en la estandarización de los primers especie-específico en *M. suis* y en los primers universales de hemoplasmas

Para la estandarización de la técnica de los primers diseñados se trabajó con controles positivos y negativos obtenidos en la reproducción experimental de la enfermedad, además de los cedidos por la Dra. Pereyra.

Para el estudio solo se utilizaron las muestras positivas a micoplasmas hemotróficos en frotis sanguíneos de distintas especies (n: 38): ratas (n: 6), ratones (n: 6), caninos (n: 8), felinos (n: 8), ovinos (n: 6), bovinos (n: 4), y porcinos (n: 64) (Figuras 9 y 10). Las mismas se mantuvieron a -20°C hasta la purificación de ADN.

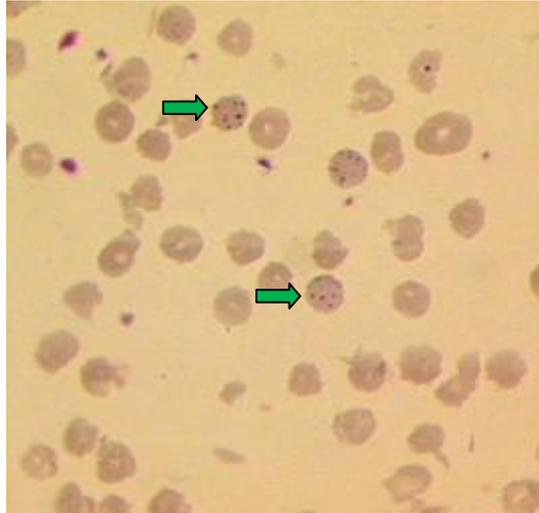


Figura 9. Frotis teñido con MGG de una muestra de sangre de ovino. Los hemoplasmas se detectaron en la superficie de los eritrocitos (flechas verdes) (1000X).

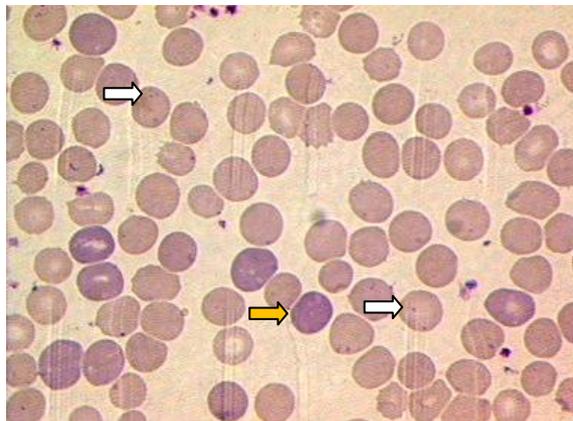


Figura 10. Frotis teñido con MGG de una muestra sangre de rata. Los hemoplasmas se detectaron en la superficie de los eritrocitos (flechas blancas). Presencia de policromasia (flecha naranja) (1000X).

1.5. - Procesamiento de las muestras de las granjas involucradas en el estudio

Se trabajó con las 482 muestras mencionadas en la sección 1 (Tabla 1). Se utilizó el mismo método de extracción de ADN, amplificación, análisis y secuenciación explicado en el punto 1.3.

1.6.- Control de calidad

Durante la etapa de estandarización y posteriormente en el procesamiento de las muestras, se realizaron controles de calidad y calibración de todo el equipamiento utilizado en el laboratorio. Durante todo el estudio se supervisó de forma constante la repetitividad y precisión del ensayo en todas las muestras procesadas (Burkhardt, 2000).

1.7.- Análisis estadístico.

Se realizó un análisis exploratorio de los datos (ADE) obtenidos con las técnicas de laboratorio. Estos análisis se realizaron mediante software de dominio público: EpiInfo™ 3.5.1 (CDC), Epidat versión 4.0 (OPS, Xunta de Galicia).

2.- RESULTADOS

Para la extracción de ADN se probaron dos protocolos, el de óxido de sílice más económico de uso común en el IGEVET y otro comercial (DNAzol, Invitrogen®). En la comparación de ambos, se observó que con el DNAzol se necesitó un volumen inicial considerablemente menor de sangre y con ADNs de mejor calidad, menor cantidad de inhibidores y de rendimiento homogéneo, lo que facilitó la extracción de muestras en las granjas porcinas.

- PCR con primers específicos para *M. suis*

Se probaron todas las posibilidades de combinaciones de primers para amplificar el gen 16S de *M. suis* en una sola ronda de PCR. Como no se detectaron productos de amplificación se decidió realizar una PCR anidada usando los primers MSuisEP1f y MSuisEP1r como primers externos y a MSuis-EP2f y MSuis-EP2r como primers internos. Con esta combinación se logró amplificar un fragmento en la segunda ronda de un tamaño aproximado de 360 bp.

- Diseño experimental en cerdos.

La obtención de los controles positivos y negativos para *M. suis* fue mediante la reproducción experimental de la enfermedad en cerdos provenientes de granjas con antecedentes a *M. suis* (Figuras 11, 12 y 13) (Pintos y col., 2013).



Figura 11. Procedimiento quirúrgico de la esplenectomía total realizada en uno de los cerdos.



Figura 12. Extracción de sangre en uno de los cerdos controles.



Figura 13. Cerdos alojados en los corrales de internación del Hospital Escuela de la FCV-UNLP.

En la Figura 14 se observan los productos amplificados, obtenidos de uno de los controles positivos a *M. suis* durante la reproducción experimental de la enfermedad, a lo largo de los 45 días post cirugía. Los productos obtenidos de la segunda ronda de amplificación dieron un tamaño aproximado 360 pb estimados a partir del marcador de peso molecular.

En la electroforesis de la Figura 14 se ve claramente como aumenta la intensidad de la banda amplificada a medida que transcurren los días posteriores a la esplenectomía en uno de los controles positivos, indicando indirectamente el pico de bacteriemia donde se ve la mayor amplificación en la calle 10 correspondiente a los 16 días post-cirugía.

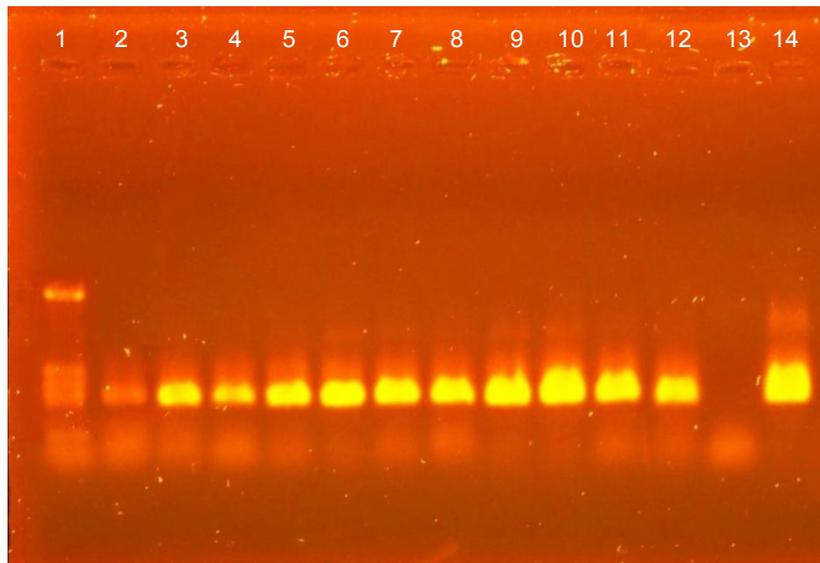


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados en la PCR anidada con los primers específicos para *M. suis*. Calle 1: marcador de peso molecular pcDNA/Hinf I (1129; 517; 453; 396 y 356 pb). Calle 2 al 12: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 días post cirugía. Calle 13: control negativo y calle 14: control positivo.

- PCR con primers universales para hemoplasmas

Para determinar la identidad de especie y la ausencia de amplificación cruzada con los hemoplasmas genéticamente similares a *M. suis* según Hoelzle y col., (2008), se amplificaron por PCR anidada con los primers universales 102 muestras provenientes de distintas especies positivas a micoplasmas en los frotis sanguíneos (Figura 15).

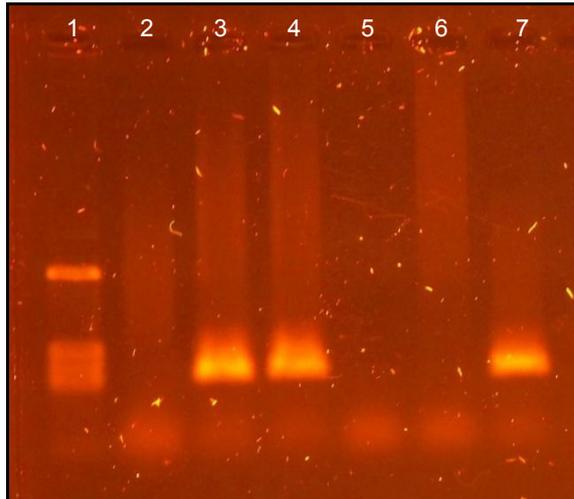


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados con los primers universales. Calle 1 marcador de peso molecular pcDNA/Hinf I (1129; 517; 453; 396 y 356 pb). Calles 2; 3; 4 y 5: Muestras de caninos. Calle 6: control negativo y calle 7: control positivo.

Los productos de amplificación, de aproximadamente 403 pb, estimados a partir del marcador de peso molecular, fueron secuenciados y comparados con el GenBank. Los resultados de las PCR se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de las amplificaciones, con una repetitividad de siete veces, de las muestras positivas al frotis sanguíneo por MGG.

Animales	Presencia de hemoplasmas en frotis sanguíneos	Productos amplificados	
		Positivos	Negativos
Ratas: 1, 4, 5	+++ ⁽³⁾	18	3
Ratas: 2, 3	++ ⁽²⁾	14	0
Rata: 6	+ ⁽¹⁾	0	7
Total Ratas (n: 6)		76,2%	23,8%
Ratones: 1, 2, 3, 4, 5, 6	++	12	30
Total Ratones (n: 6)		28,6%	71,4%
Caninos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	+	8	48
Total Caninos (n: 8)		14,3%	85,7%
Felinos: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8	+++	49	0
Felino: 5	++	4	3
Total Felinos (n: 8)		94,6%	5,4%
Ovinos: 1, 3, 4, 5, 6	+++	35	0
Ovino: 2	++	6	1
Total Ovinos (n: 6)		97,6%	2,4%
Bovinos: 1, 2, 3, 4	++	20	8
Total Bovinos (n: 4)		71,4%	28,6%
Porcinos: del 11 al 64	+++	299	79
Porcinos: del 1 al 10	++	40	30
Total Porcinos (n: 64)		75,7%	24,3%

Clasificación de acuerdo a la carga bacteriana en el frotis: ⁽¹⁾ +; ⁽²⁾ ++ y ⁽³⁾ +++.

Se secuenciaron seis muestras positivas por PCR de *M. suis*. Para cada una del resto de las especies hemotróficas se secuenciaron tres muestras. Luego se las compararon con las secuencias disponibles en GenBank con el algoritmo BLAST (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados obtenidos de la comparación de las secuencias con las bases de datos mediante el programa BLAST.

Especie	Identidad	n° de acceso
Porcinos	<i>M. suis</i> 100%	KF740480.1
	<i>M. parvum</i> 100%	NR_121759.1
Bovinos	<i>M. wenyonii</i> 98%	FN392885.1
Ovinos	<i>M. ovis</i> 99%	KF313922.1
Caninos	Uncultured <i>Mycoplasma sp.</i> 87%	KT215635.1
	<i>M. haemomuris</i> 99%	AB820289.1
Felinos	“ <i>Candidatus M Haemominutum</i> ” 97%	KM275254.1
Ratas	<i>M. haemomuris</i> 99%	AB820289.1
Ratones	Uncultured <i>Mycoplasma sp.</i> 93%	KU512719.1

- Resultados obtenidos en el procesamiento de las muestras provenientes de GI y GSI

En la Figura 16 se observan algunos de los amplificados de las 482 muestras de sangre provenientes de cerdos de GI y GSI. En todas las amplificaciones se obtuvo un producto de 360 pb confirmándose posteriormente por secuenciación un tamaño de 366 pb, coincidente con el tamaño esperado por análisis bioinformático.

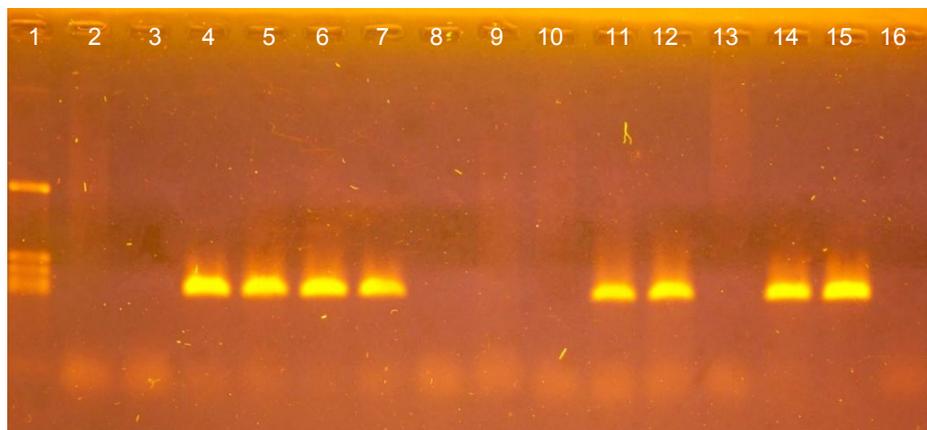


Figura 16. PCR con primers específicos para *M. suis*.

Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados en la PCR anidada con los primers específicos para *M. suis*. El tamaño del producto de amplificación fue de aproximadamente 360 pb. Calle 1: marcador de peso molecular pcDNA/Hinf I (1129; 517; 453; 396 y 356 pb). Calles 2 al 14: Muestras de cerdos. Calle 15: control positivo y Calle 16: control negativo.

Se observó una prevalencia general en muestras sanguíneas del 36% (172/482) de animales positivos a *M. suis* mediante PCR (Tabla 10):

Tabla 10. Prevalencia de *M suis* en muestras sanguíneas entre GI y GSI.

Resultados	<i>M. suis</i> (+)	<i>M. suis</i> (-)	Total	Prevalencia
GI	88	214	302	29,0%
GSI	84	96	180	46,6%
Total	172	310	482	36,0%

Se observó asociación estadísticamente significativa entre presencia de *M suis* en granjas intensivas y semiintensivas ($\chi^2_{(1, n: 482)} = 15,1; p=0,0001$).

Los resultados obtenidos de *M. suis* positivos según categorías se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Prevalencia de *M. suis* en muestras sanguíneas de diferentes categorías entre GI y GSI.

Categoría	GI	GSI
Maternidad (lechones y madres)	24%	53%
Recría	42%	40%
Desarrollo y Terminación	18%	43%

3.- DISCUSIÓN

Si bien se logró una buena purificación de ADN, no se obtuvo una buena repetitividad con los primers y programas de ciclado descritos en los trabajos de Messick y col., (1999) y Hoelzle y col., (2003). Esto puede deberse que estos diseños generaban amplificadas de un tamaño de banda de aproximadamente 900 pb lo que dificultó su amplificación.

Los controles obtenidos del trabajo experimental coincidieron en las múltiples amplificaciones con una alta repetitividad como los controles cedidos por Pereyra y col., (2004).

En nuestro país aún no hay estudios publicados de prevalencia entre las especies. Los resultados obtenidos de los ADNs secuenciados (n: 8), mostraron 97%

de identidad con “*Candidatus M Haemominutum*” coincidiendo con lo publicado por otros autores (Sykes y col., 2010; Aquino y col., 2014; Willi y col., 2007).

Actualmente hay descritas tres especies de hemoplasmas específicas en los felinos. Ellas son: *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” y “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (Campos Aquino y col., 2014). Estas tres especies difieren entre sí en cuanto a patogenicidad, si bien *M. haemofelis* causa las anemias más severas, la de mayor prevalencia en muchos países es “*Candidatus M. haemominutum*”.

En investigaciones recientes se ha detectado la presencia de *M. suis*, *M. haemofelis* y *M. ovis* como agentes zoonóticos en pacientes humanos inmunosuprimidos (Zhe Hu y col., 2009; Yuan y col., 2009; Maggi y col., 2013; Hoelzle y col., 2014).

Vieira y col. (2015) trabajaron con qPCR para determinar la prevalencia de los hemoplasmas en la población de caninos, equinos y humanos altamente expuestos a las picaduras de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en el sur de Brasil y analizaron los factores asociados con la infección de hemoplasmas, donde no se observó transmisión inter-especies.

En Estados Unidos con PCR obtuvieron una prevalencia de 4,7% en veterinarios, técnicos veterinarios y cónyuges infectados por micoplasmas hemotróficos. Los hemoplasmas aislados fueron principalmente *M. ovis*, *M. haematoparvum* y *M. spp* (Maggi y col., 2013).

La secuenciación de algunos de los ADNs amplificados a partir de caninos mostraron identidad con Uncultured *Mycoplasma sp*, mientras que en dos muestras también se encontró identidad con *M. haemomuris*. De acuerdo a nuestro

conocimiento este sería el primer reporte a nivel mundial de identificación de *M. haemomuris* en caninos. Sería interesante realizar un estudio epidemiológico para poder confirmar su presencia y determinar la prevalencia de esta especie en perros domésticos.

Debido a que *M. suis* no se puede cultivar (Nonaka y col., 1996; Messick y col., 2004; Schreiner y col., 2012a; Hoelzle y col., 2014) y que este estudio se realizó mediante un método cualitativo de PCR, no se pudo determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica. A pesar de esto, el uso de los primers diseñados ayudo a identificar *M. suis* en todas las muestras procesadas utilizando una PCR anidada convencional.

Cuando se diseñaron los primers especie-específicos de *M. suis*, se pensaba que *M. parvum* y *M. suis* eran una sola especie que cambiaba de forma y tamaño a medida que maduraba (Splitter y col., 1950; Pereyra y col., 2004). Por esto, en el diseño se consideró a las secuencias de *M. parvum*, en ese momento llamado “*Candidatus M. haemoparvum*”, como equivalentes a *M. suis*. Hasta el 2012 las secuencias de los amplificados cuando se compararon con el algoritmo BLAST dieron valores de similitud próximos al 100% tanto con *M. suis* como con *Candidatus M. haemoparvum*. En este último caso se consideraba que la secuencia correspondía a *M. suis*.

A partir del 2013 luego de la secuenciación del genoma de *Candidatus M. haemoparvum* se lo clasificó como una especie diferente de *M. suis* y se lo denominó formalmente *M. parvum* (Do Nascimento y col. 2013; Do Nascimento y col., 2014). Desde entonces las secuencias que dieron identidad con *M. parvum*, fueron consideradas como una especie diferente a *M. suis*.

Finalmente estos primers amplifican indistintamente *M. suis* o *M. parvum*. De la comparación de las secuencias del fragmento amplificado entre las dos especies surge que no existen nucleótidos únicos o específicos de una u otra especie, tampoco existe esta diferencia en el resto del gen 16S, por lo tanto, ni siquiera mediante la secuenciación de este gen se podría identificar la especie que produce la infección. Entonces, sería necesario el diseño de nuevas técnicas para poder diferenciar ambas especies, dirigidas a las regiones del genoma que mostraron diferencias y permitieron clasificar a estos hemoplasmas como distintas especies.

Se confirmó mediante secuenciación que los primers diseñados para *M. suis* siempre amplificaron *M. suis-M. parvum* validando su especificidad de especie durante todo el procesamiento de las muestras y resaltando la no amplificación con ningún otro hemoplasma de las especies utilizadas (ovinos, felinos, caninos, bovinos, ratas y ratones).

Por último, de acuerdo a los datos obtenidos en la población estudiada mediante PCR, se obtuvo una prevalencia general de *M. suis-M. parvum* en porcinos del 36% (172/482), a diferencia de los estudios hematológicos en los cuales se obtuvo mediante MGG el 34% (164/482) de positivos a *M. suis-M. parvum*. Estos datos no pueden compararse con otros trabajos ya que es la primera vez en nuestro país que se llevan a cabo estudios hematológicos y de biología molecular en forma simultánea en animales infectados naturalmente por *M. suis*.

4.- CONCLUSIONES

- Solo con 1 ml de sangre se pudo realizar el hemograma, los frotis por duplicado y la extracción de ADN, obteniendo una muestra de buena calidad de extracción. Por lo tanto el DNAzol fue el kit de elección para realizar éste trabajo de tesis.
- El uso de los primers diseñados permitió identificar micoplasmas hemotróficos en las muestras procesadas, utilizando una PCR convencional anidada y obteniendo en la amplificación el gen ribosomal 16S de los hemoplasmas.
- Con el diseño de la PCR anidada logramos repetitividad y especificidad de las amplificaciones.
- Estos primers permitieron conocer la prevalencia de *M. suis-M parvum* en GI y GSI, en las diferentes categorías, en la provincia de Buenos Aires.
- Hasta donde sabemos, este es el primer diseño y puesta a punto de una PCR específica para *M. suis-M. parvum* realizada en nuestro país.
- Los primers universales desarrollados en este trabajo para identificar hemoplasmas se pueden utilizar en el diagnóstico de la enfermedad en otras especies de animales (felinos, caninos, ovinos, bovinos, ratas y ratones).
- El uso de estos primers permitió detectar *M. haemomuris* en perros domésticos, siendo hasta el momento, el primer reporte a nivel mundial.

Estudios de PCR para la detección de PCV-2 en muestras de sangre y su relación con *M. suis*

Antes del uso de vacunas, el diagnóstico de PCV-AD se basaba principalmente en los signos clínicos, estudios anatomopatológicos, inmunohistoquímicos y serológicos. Con la implementación de los programas de vacunación en nuestro país hubo que replantearse cuáles métodos de diagnóstico podían seguir siendo utilizados.

Por lo expuesto en este trabajo de tesis se decidió implementar una técnica de PCR anidada para la detección del virus y no utilizar la prueba serológica de ELISA planteada en un principio, ya que los animales han recibido vacunación (Pereyra y col., 2005; Watanabe y col., 2012).

1.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.- Diseño de primers para PCV-2

Para el diseño de los primers se utilizaron las secuencias del genoma completo disponibles en GenBank de los circovirus porcinos tipo 2. Luego se realizó un alineamiento utilizando el software ClustalX 2.1 (Larkin y col., 2007) y se creó una secuencia consenso con un umbral de frecuencia para la inclusión del 100% utilizando el programa BioEdit (Hall y col., 1999).

Sobre este consenso se ubicaron los primers diseñados por Fort y col., (2007). Debido a que las secuencias disponibles actualmente revelan una variabilidad que no estaba contemplada por los primers descriptos, se decidió

modificarlos en su longitud y se les agregaron algunas indeterminaciones de modo que sean capaces de amplificar cualquiera de las variantes existentes. Como resultado se obtuvieron dos pares de primers externos y dos internos, con el objeto de utilizarlos en una PCR anidada para detectar PCV-2 (Tabla 12).

Tabla 12. Primers PCV-2 especie-específico utilizados en la PCR anidada.

Autores	Primers	Tamaño⁽¹⁾
(Propios, 2014)	PCV-2F1, (5'- CYTTTTTATCAYTTCGTAATG-3') ⁽²⁾	760 bp
	PCV-2R1 (5'- CGCACTTCTTTCGTTTTTC-3') ⁽²⁾	
	PCV-2F2,(5'-GGGAGGAGTAGTTTACATA-3') ⁽³⁾	150 bp
	PCV-2R2,(5'-RCCCTTTGAATACTACAGA-3') ⁽³⁾	

⁽¹⁾Tamaño esperado del producto amplificado, ⁽²⁾par externo y ⁽³⁾par interno

1.2.- Muestras utilizadas con los primers para PCV-2

Se trabajo con 482 muestras (sección 1, Tabla 1), divididas en:

Animales vacunados contra PCV-2: n: 355 (232 GI y 123 GSI)

Animales no vacunados contra PCV-2: n: 127 (70 GI y 57 GSI)

Además se utilizaron (2 controles positivos y 2 negativos de PCV-2, corroborados por qPCR y cedidos por la Dra. Dibárbora M., del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Buenos Aires, Argentina.

1.3.- Extracción de ADN

Para la purificación de ADN de las muestras de suero, se uso por un lado el Kit comercial (n: 30) (Nucleospin®Blood, Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Germany), utilizado por Quintana y col., (2001); Segalés y col., (2005); Olvera y col., (2008). En forma simultánea se trabajó con las muestras de ADN extraídas con DNAzol (Invitrogen®) utilizadas en la sección 2 para detección de micoplasmas.

1.4.- Amplificación con los primers para PCV-2

a) Reacción

Se utilizaron las mismas condiciones de reacción que para micoplasmas, (sección 2, punto 1.3).

b) Ciclado

El programa de ciclado consistió en 2 min de desnaturalización a 92°C, 35 ciclos de: 30 seg de desnaturalización a 92°C, 30 seg de annealing a 42°C y 40 seg de elongación a 72°C, finalizando con 4 min de extensión a 72°C. La PCR anidada en PCV-2 consistió en dos rondas de amplificación, en la primera se utilizaron 2 µl de ADN muestra y en la segunda ronda 1 µl del producto de la primera ronda.

c) y d) se trabajó con la misma metodología de análisis y de secuenciación que para micoplasmas.

Durante la etapa de estandarización y posteriormente, en el procesamiento de las muestras, se realizaron controles de calidad y calibración de todo el equipamiento utilizado en el laboratorio.

1.5.- Análisis estadístico.

Se realizó un análisis exploratorio de los datos (ADE) obtenidos con las técnicas de laboratorio, mediante EpiInfo™ 3.5.1 (CDC), Epidat versión 4.0 (OPS, Xunta de Galicia).

2.- RESULTADOS

La calidad y cantidad de ADN obtenidas de suero con el kit Nucleospin®Blood, y de sangre mediante el DNAzol de Invitrogen® sobre 30 muestras fueron muy buenas con ambos métodos y los resultados de las amplificaciones resultaron equivalentes. Por tal motivo, se optó por utilizar las muestras ya extraídas con DNAzol que se utilizaron con los micoplasmas. De esta manera, se mantuvo el procesado de las muestras en forma sistemática obteniendo en una sola extracción de ADN muestra para la detección para micoplasmas y PCV-2.

Luego se realizó una PCR anidada usando los primers PCV-2F1 y PCV-2R1 como primers externos y PCV-2F2 y PCV-2R2 como primers internos. Con esta combinación se observó en el análisis de electroforesis, un fragmento interno de aproximadamente 150 pb, correspondiente a la segunda ronda de amplificación. Como controles positivos se utilizaron los ADNs cedidos por la Dra. Dibárbora, con una repetitividad del 100%.

Los productos de amplificación fueron secuenciados reiteradamente durante el procesamiento de las muestras y al analizarlos mediante el algoritmo BLAST siempre dieron similitud con PCV-2, validando su especificidad.

En la Figura 17 se observan algunos de los productos amplificados de las 482 muestras de sangre.

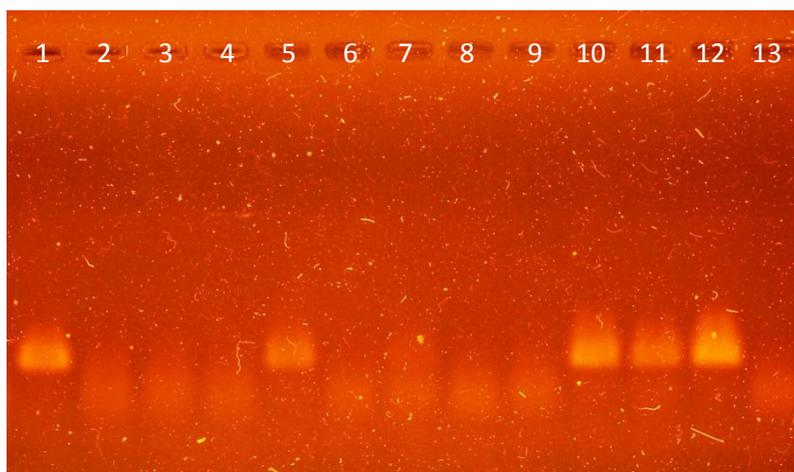


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados en la PCR anidada con los primers para PCV-2. Calle 1: marcador de peso molecular: fragmento de 150 pb. Calle 2 al 11: muestras de cerdos. Calle 12: control positivo y calle 13: control negativo.

Se observó una prevalencia serológica general del 31,7% (153/482) a PCV-2 mediante PCR (Tabla 13):

Tabla 13. Prevalencia de PCV-2 entre GI y GSI (en animales vacunados y no vacunados)

Resultados	PCV-2 (+)	PCV-2 (-)	Total	Prevalencia serológica
GI	99	203	302	32,8%
GSI	54	126	180	30,0%
Total	153	329	482	31,7%

No se observaron diferencias estadísticamente significativa entre presencia de PCV-2 en granjas intensivas y semiintensivas ($\chi^2 = (1, n: 482) 0,40; p=0,52$).

En la tabla 14 se observa la relación entre *M. suis* y PCV-2 en el total de las muestras analizadas.

Tabla 14. Relación entre *M. suis* y PCV-2 en muestras provenientes de GI y GSI

Resultados	PCV-2 (+)	PCV-2 (-)	Total	Prevalencia serológica
<i>M. suis</i> (+)	42	130	172	35,7%
<i>M. suis</i> (-)	111	199	310	64,3%
Total	153	329	482	100%

Del 31,7% (153/482) animales positivos a PCV-2 mediante la técnica de PCR solo el 8,7% (42/482) animales fueron positivos también por PCR a *M. suis*.

3.- DISCUSIÓN

Existen varios trabajos que mencionan la asociación entre las infecciones producidas por hemoplasmas y las enfermedades virales, neoplásicas e inmunomediadas, principalmente en felinos (Messick y col., 2004; Neimark y col., 2002; Hoelzle y col., 2014; Willi y col., 2005; Willi y col., 2007), en cambio en cerdos se han observado casos asociados a infecciones por virus de la peste porcina clásica, estreptococosis, toxoplasmosis, SMAP y PRSS (Henry y col., 1979; Pereyra y col., 1990; Heinritzi y col., 2000; Messick y col., 2004; Pereyra y col., 2004).

En el año 2004 se realizó el primer estudio en forma conjunta de *M. suis*-PCV-2 basado en estudios anatomopatológicos, hematológicos, bacteriológicos e histopatológicos (Pereyra y col., 2004).

El presente trabajo de tesis es el primero que se realiza en Argentina utilizando técnicas de PCR anidada y secuenciación para el diagnóstico de *M. suis*-PCV-2.

4.- CONCLUSIONES

- La modificación de la técnica de PCR permitió detectar la presencia de PCV-2 en las muestras analizadas.
- La detección de PCV-2 fue semejante en muestras de ADN a partir de sangre total como las de suero.
- Una misma extracción de ADN se utilizó para la detección de micoplasmas como para PCV-2.
- De las muestras analizadas con las técnicas de PCR se obtuvo una relación entre *M. suis* y PCV-2 del 8,7% en animales infectados naturalmente.

Estudios anatomopatológicos e inmunohistoquímicos de los animales seleccionados para el diagnóstico de infección por *M. suis* y PCV-2, en muestras de bazo y linfonódulos respectivamente.

1.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.- Toma de muestras y procesamiento

Se estudiaron muestras, de 44 cerdos hallados muertos o muertos por eutanasia humanitaria, con una edad entre 25 y 154 días de vida. Los animales provenían de 11 GI incluidas en el estudio.

Como antecedente, en ellas no se registraba vacunación contra PCV-2 y eran positivas a *M. suis* mediante la técnica de PCR.

Se realizaron las necropsias completas de animales de distintas categorías. En su mayoría presentaron signos clínicos compatibles con PCV-2, tales como: anorexia, decaimiento, dificultad respiratoria, diarrea y retraso en el crecimiento. Se realizó la correlación de los hallazgos histopatológicos, en particular a enfermedades asociadas a PCV-2. El diagnóstico presuntivo de la causa de muerte o retraso en el crecimiento, se realizó sobre la base de los hallazgos macroscópicos, agrupándose los mismos a criterio del patólogo por orden de significación y sistemas, aparatos u órganos comprometidos. Se tomaron muestras de linfonódulos, pulmón, bazo, hígado y riñón. Las mismas se fijaron en formol neutro al 10%, se incluyeron en parafina y se colorearon con hematoxilina y eosina para realizar los estudios histopatológicos.

1.2.- Técnica de inmunohistoquímica

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica para PCV-2 utilizando como anticuerpo primario: suero policlonal anti-circovirus porcino tipo 2 (Lab VRMD[®]: suero policlonal anti-circovirus porcino tipo 2 (elaborado en cerdo), dilución 1:200).

Los cortes de tejidos de las muestras fueron desparafinados con xileno y rehidratados a través de distintas graduaciones de alcoholes. Luego los portaobjetos se colocaron en H₂O₂ al 3% durante 15 min para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. En el paso siguiente los cortes se clarificaron durante 5 min en PBS 0,1 M (pH 7,5) y fueron incubados con proteasa XIV 0,05% precalentada durante 40 min. Luego se realizó el lavado en PBS y se cubrieron con 0,5% con leche descremada en PBS durante 20 min a temperatura ambiente, con el fin de inactivar uniones inespecíficas.

El anticuerpo primario se utilizó en una dilución 1/200 en PBS 0,1 M y se incubó durante 1 h a 37°C. Como anticuerpo secundario se utilizó un Ac- biotinilado de Proteína G (1/500) concentración 1:200 (Sigma[®] – Código: P8045-250UG Protein G, recombinant-biotin labeled) (Concentración sugerida 10µg/ml) y se incubaron durante 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente se aplicó como sistema de revelado: Estreptavidina-peroxidasa (LSAB2/HRP[®], Universal rabbit-mouse– DAKO- Código: K0673 CA, EE.UU.) durante 15 min a temperatura ambiente. Por último los cortes de tejido se incubaron durante 8 min en diaminobenzidina hidrogenada en solución de peróxido (cromógeno DAB) y luego se contratiñeron con hematoxilina de Harris. Se trabajó con controles positivos y negativos. La reacción de inmunohistoquímica en los cortes de tejido fue clasificada en base a la intensidad de inmunomarcación de la siguiente manera: (+) = leve; (++) = moderado y (+++) = fuerte (Pereda y col., 2011).

1.3.- Análisis estadístico

Se realizó un análisis exploratorio de los datos (ADE) y de los resultados obtenidos con las técnicas anatomopatológicas e inmunohistoquímicas de los animales seleccionados para el diagnóstico de infección por *M. suis* y PCV-2.

2.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los estudios anatomopatológicos de las muestras de los 44 cerdos con una edad entre 25 a 154 días de vida se detallan en la tabla 15.

Tabla 15. Hallazgos macroscópicos, de los cerdos estudiados provenientes de granjas positivas a *M. suis* y sin vacuna contra PCV-2

Hallazgos macroscópicos	%	(n° de animales)
Necrosis de orejas, cianosis, edema en piel	4,5%	2
Linfonódulos agrandados	45,45%	20
Neumonía	20,45%	9
Bronconeumonía	38,63%	17
Poliserositis	63,6%	28
Esplenomegalia	11,35%	5
Úlcera gástrica G4	6,8%	3
Riñones agrandados/ manchas blancas	13,6%	6
Endocarditis /Pleuritis	9%	4

Los resultados obtenidos de los estudios histológicos de las muestras de los 44 cerdos con una edad entre 25 a 154 días de vida se detallan en la tabla 16.

Tabla 16. Diagnóstico histopatológico de los cerdos estudiados provenientes de granjas positivas a *M. suis* y sin vacuna contra PCV-2

Diagnóstico histopatológico	%	(n° de animales)
Linfoadenitis granulomatosa	54,5%	24
LN ⁽¹⁾ con depleción linfoidea	27,27%	12
LN con células gigantes	11,3%	5
Neumonía intersticial	31,8%	14
Bronconeumonía	45,45%	20
Bronquitis/ Bronquiolitis	4,5%	2
Nefritis intersticial no supurativa	40,9%	18
Glomerulonefritis fibrino-necrótica	20,45%	9
Perivasculitis/ Enteropatía/ Pleuritis	9%	4
SLD ⁽²⁾	18,8%	8

⁽¹⁾Linfonódulos y ⁽²⁾sin lesiones diagnosticadas.

En la tabla 17. Se exponen los resultados obtenidos mediante la técnica de IHQ, sumado al diagnóstico final de los cerdos estudiados, provenientes de granjas positivas a *M. suis* y sin vacuna contra PCV-2.

Tabla 17. Resultados de la prueba de IHQ , sumado al diagnóstico final de los cerdos estudiados, provenientes de granjas positivas a *M. suis* y sin vacuna contra PCV-2

Prueba de IHQ Positiva	Diagnóstico final	Prueba de IHQ Negativa	Diagnóstico final
6 animales	PCV-2 AD y Enteropatía proliferativa porcina producida por <i>Lawsonia intracellularis</i> .	8 animales	SLD
25 animales	PCV-2 AD y Neumonía enzoótica porcina producida por <i>M. hyopneumoniae</i> .	2 animales	Neumonía viral
		3 animales	Bronconeumonía y Poliserositis
Total: 31 animales		Total: 13 animales	

La prueba de IHQ confirmó 31 de los 44 casos sospechosos a PCV-2-AD (70,5%).

En las figuras 18 y 19 se muestran una de las muestras analizadas mediante las técnicas de coloración de Hematoxilina y eosina y de IHQ.

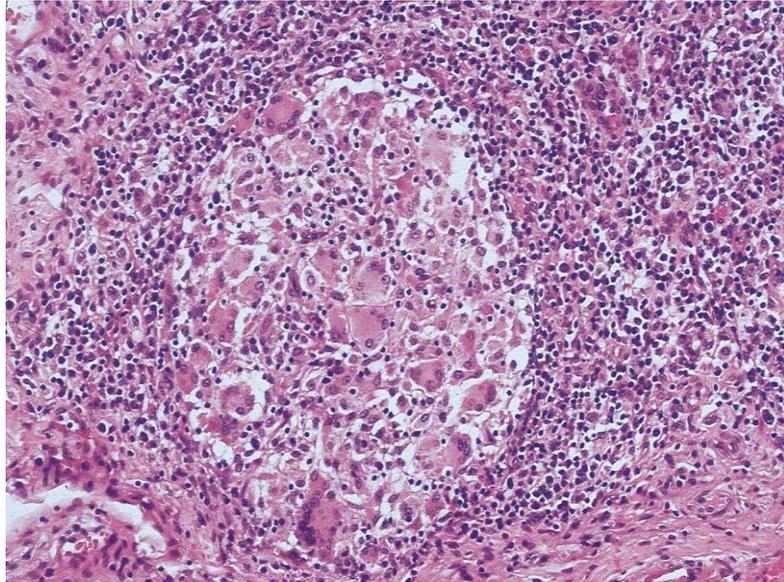


Figura 18. Linfadenitis granulomatosa por PCV-2. H&E. (400X)

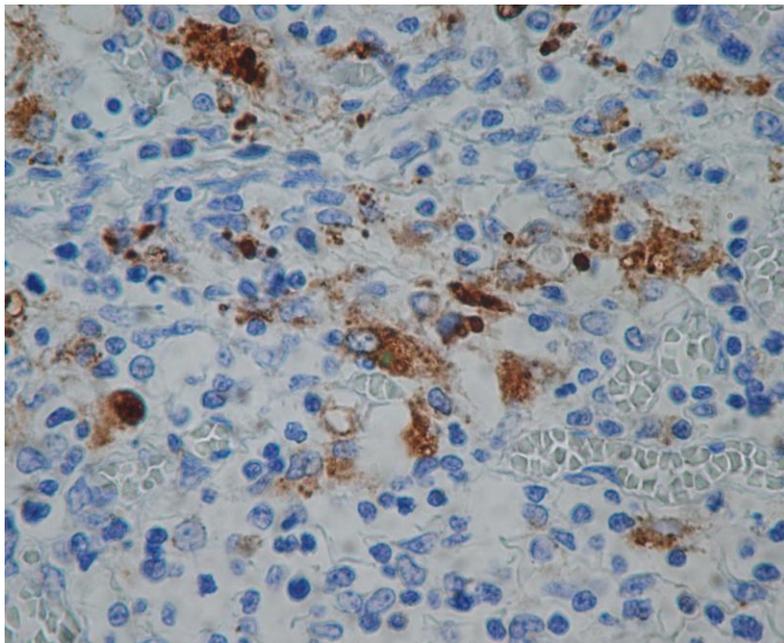


Figura 19. Linfadenitis granulomatosa por PCV-2. IHC + (LSAB-2). (400X)

3.- DISCUSIÓN

El SMAP es una enfermedad sistémica que se caracteriza por retraso en el crecimiento, incremento de la mortalidad, ictericia y lesiones macro y microscópicas características en múltiples órganos, principalmente en órganos linfoides (Clark, 1997; Rosell y col., 1999).

En este trabajo los signos clínicos más observados fueron decaimiento, dificultad respiratoria y retraso en el crecimiento, presentándose en animales entre los 60 y 157 días de vida, en forma similar a lo hallado por otros autores (Segalés y col., 2005; Cappuccio y col., 2006).

Los hallazgos patológicos y las lesiones de esta enfermedad se localizan principalmente en los linfonódulos. Los pulmones se pueden encontrar edematosos, no colapsados y de consistencia firme. El hígado puede encontrarse agrandado y en la corteza renal pueden hallarse focos blanco grisáceos (riñón a machas blancas) (Rosell y col., 2000).

La lesión macroscópica que se presentó con mayor porcentaje fue la poliserositis y las observadas en el sistema linfohematopoyético, respiratorio y urinario. A diferencia de otros autores se encontró un bajo porcentaje de lesiones en el aparato digestivo. Así mismo el examen histopatológico se caracterizó por depleción linfoide y marcada infiltración de células gigantes, a diferencia de otros estudios, en los que se acompañó por una marcada infiltración de células histiocíticas y la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, no observados en nuestro estudio (Gava y col., 2005; Segales y col., 2004).

Los cuadros neumónicos son un hallazgo frecuente en SMAP, en particular la neumonía intersticial (Sorden, 2000; Gava y col., 2005; Segalés y col., 2004). En el estudio realizado fue baja su frecuencia, no así el de los cuadros de bronquitis o bronconeumonía causados por diversos agentes que podrían actuar como cofactores.

4.- CONCLUSIONES

- Si bien son numerosas las variables que, en condiciones de campo, incidirían en la frecuencia de los órganos afectados y tipo de lesiones de SMAP, su estudio comparativo con la prueba de IHQ, en estos establecimientos no vacunados contra PCV-2, permitió confirmar el diagnóstico, como así también asociarlo a otras enfermedades y considerar en su presentación el antecedente de que todas las granjas involucrada en este estudio eran positivas a *M. suis*.

CONCLUSIONES GENENERALES

- Para disminuir los factores de riesgo que inciden en la diseminación de la enfermedad producida por *M. suis* se deben tener en cuenta, los sistemas de ventilación de las salas y frecuencia de limpieza de las mismas. Además implementar programas de desinfección de roedores y vectores hematófagos debido que varios estudios sugieren que *M. suis* es un potencial agente zoonótico.
- El signo clínico más relevante en los animales infectados naturalmente por *M. suis* fue anemia, presentándose principalmente en la categoría de lechones y recría.
- Se sugiere implementar estudios hematológicos como complemento en el diagnóstico clínico, aportando de esta manera información sobre la presencia de la bacteria con la coloración de MGG, como también las alteraciones en la morfología celular sanguínea.
- El uso de los perfiles bioquímicos, en animales infectados naturalmente, en este estudio, no tuvo un aporte significativo en el diagnóstico clínico. Solo se observó hiperbilirrubinemia en el 4% de lechones con anemia severa.
- Los avances tecnológicos del equipamiento de laboratorios de diagnóstico permitió reducir el volumen de la muestra individual. A efectos de realizar el estudio hematológico, bioquímico y técnicas de PCRs en forma simultánea, se facilitó la tarea al profesional en el momento del muestreo.
- Este es el primer diseño y puesta a punto de una PCR específica para *M. suis-M. parvum* realizada en nuestro país.
- Con esta técnica se aportaron datos sobre la prevalencia de *M. suis- M. parvum* en animales infectados en forma natural provenientes de GI y GSI de la provincia de Buenos Aires.

- Las PCRs diseñadas en este trabajo permitieron detectar la presencia de *M. suis*-*M. parvum* en cerdos así como otros micoplasmas hemotróficos en especies domésticas y animales de laboratorio.
- Los primers desarrollados para hemoplasmas universales en este trabajo se pueden utilizar en el diagnóstico de la enfermedad en otras especies de animales (felinos, caninos, ovinos, bovinos, ratas y ratones).
- El uso de primers universales para hemoplasmas permitió detectar *M. haemomuris* en perros domésticos, siendo hasta el momento, el primer reporte a nivel mundial.
- De las muestras analizadas con las técnicas de PCR se obtuvo una relación entre *M. suis* y PCV-2 del 8,7% en animales infectados naturalmente.
- En animales con sospecha de signos clínicos de SMAP, en granjas no vacunadas, mediante los estudios anatomopatológicos e IHQ se confirmó el diagnóstico de PCV-2 y la presencia de *M. suis*.
- El presente trabajo de tesis es el primero que se realiza en Argentina utilizando técnicas de PCR anidada y secuenciación para el diagnóstico de *M. suis*-PCV-2.
- Si bien los primers diseñados resultaron tener buena repetitividad se prevé implementar técnicas de qPCR a efectos de cuantificar el grado de infección para poder implementar medidas terapéuticas de prevención en las granjas porcinas que cursan con infecciones subclínicas, debido a existen portadores asintomáticos en ambos tipos de explotaciones, siendo mayor en las GSI.

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CMhaemominutum	YCCATAGGTTTR	AKWCYY	MAATTAAARGRRG	CGDDYRGGHRAYYR	GWGCYTYRS	GWYAGAGAGAGG	TATGTCCTATTAGG	TTGWTG		
CMhaemoparvum	.T.....
Movis	.A.....	TG...GT	CC.C	M.C.G.A.AG	.A.W	A
Mwenyonii	T.A...	RA.AMT	A
CMhaemolamae	GATT	TGA.A.AGTCT	CCG.A	C.T.CA.A.T	A
MhaemofelisAG...TATCY.T	G.TTT.CTT.AA.C	CT.CGGG	.TGAGG.RWTK.GA	CT	C.A
MhaemocanisAGY...TATC.C	G.TTT.CTT.AA.C	CT.CRGG	.TGAGG.TT.GA	CT	C.A
Mhaemuris	.T.....	.C...CCTC.C	G.G.TT.T.AA	C.CAAGC	.T.G.TT	T.T	C.A
CMturicensis	.T...T	.CY...YHYCRR	CAGR	AT.AA	T.MAAAC	CGRRG.TT	A
McocoidesAC...CTCA.G	G.G...TTTT.AA	CAA.C	.T.TGG.TT	A	CT
Mparvum	G.....	T...AATTAG	TGA.T.AATTT	R.....	T.C.G.AA	G.TG.....	GA.GA.T	A
Msuis	K.....	K...RRYTAGAKGA	.Y.ARYTT	W.....	T.C.G.MAA	G.TG.....	GR.RA.T	R
MSuis-EP1-F	AAWGGAGG	CTGCCGMAA	GGT
MSuis-EP2-F	AGRTMGTTG

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CMhaemominutum	GTGGGGTAAHWG	CYTACCAASC	CGWTGATGGG	TAGCTGGACTGAGD	GSTYGACCAS	CCGCRATGGG	ATTGAAATAC	CGGCCCATAT	TYCYTACGGG	AWGCAG
CMhaemoparvum	G.....	Y.....	T.....
Movis	.C.....	G..C..	A.....	A.....	G..T.....
Mwenyonii	.C.....	G..C..	AR.R.....	WW.....	G..WT.....
CMhaemolamae	.C.....	G..C..	G.....	A.....	GA.....	W.....	G..T.....
Mhaemofelis	.C..A.....	C..G.A...	A.A.....	T.T.....	A..A..A	G.....	R.....
Mhaemocanis	.C..A.....	C..G.A...	A.A.....	T.T.....	A..A..A	G.....
Mhaemuris	.C..A.....	C..G.AG...	A.A.....	T.A.....	A..A..A	G.....
CMturicensis	.C..R.....	C..G.R...	A.....	T.A.....	A..A..A	G.....	Y.....
Mcocoides	.C.....	G..C..	A.T...A.A	T.T.....	A..A..A	G.....
Mparvum	.A.A.....	G..C..	A.....	G.A.T.....
Msuis	.A.A.....	DG..C..	Y.....	A.....	G.W.T.....
MHemo-EP1-F	ATYCYTRCRGGAWGCAG
Msuis-EP2-F	GAGAGGTAADGG	CT

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500										
CMhaemominutum	CAGT	GAGGAA	TTTTTC	CACAAT	GGAC	GAAAGT	CTGAT	GGAG	CAATAC	CCATG	TGAAC	GATSA	AGGTC	TTYT	GATTG	TAAAG	TTCT	TTTTA	TTTAG	KAAAAA
CMhaemoparvum																				
Movis																				
Mwenyonii																				
CMhaemolamae																				
Mhaemofelis																				
Mhaemocanis																				
Mhaemuris																				
CMturicensis																				
Mcocoides																				
Mparvum																				
Msuis																				
MHemo-EP1-F	CAG																			
MHemo-EP2-F																				

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600												
CMhaemominutum	AGYTT	GAKAGG	AAATG	ATTAAG	YCTTG	ATWGT	ACTAR	ATGA	ATAAG	TGAC	ARCTA	ACTAT	GTG	CCAG	CAGCT	GCGG	TAAAA	CATAG	GGTC	CACG	AGCATT	AT
CMhaemoparvum																						
Movis																						
Mwenyonii																						
CMhaemolamae																						
Mhaemofelis																						
Mhaemocanis																						
Mhaemuris																						
CMturicensis																						
Mcocoides																						
Mparvum																						
Msuis																						

	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
CMhaemominutum	GCTGAGGCTTGAAAGCGTGGGRAGCAAATGGGA	TTAGATACCCCAAGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGGTATTAGGTATYTTGG	TYWAGGACTGAGTGC							
CMhaemoparvum				A				K	K	A.A.A.T
Movis			Y		Y			A.C	A	G.TA.GTC
Mwenyonii	R	KR	M		K			R	R.C	R.Y.A-CA.CTRGTCR
CMhaemolamae	A							Y		AA
Mhaemofelis	T	T				R		A	A	GC.TA.CT.T
Mhaemocanis	T	T				A		A	A	GC.TA.CT.T
Mhaemurris	T	C	T			A		A	G	AC.GA.T.C.C.T
CMturicensis	T	Y	T	T	R		V	A	A	G.G.AY.GWRTT.CG.C.T
Mcocoides	T		T	T				A		GC.G.G.GA.CT.CG
Mparvum			T							TC.A.A.A.A
Msuis			T							TC.RA.A.W.R.A
MHemo-EP1-R						GATACCYCAGTAGTCCVCRC				
MHemo-EP2-R	GGCTBRAAAGYGTGGGDAG									

	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
CMhaemominutum	TGTAGCTAACCGCTTAAATACCCCGCCTGGG	TAGTATATATGCAAATATGAAAC	TCAAAGAAATTGAYGGGGACCTGAACAAGTGGTGGAGCATGTTG							
CMhaemoparvum				G		C				
Movis		G.T				M				
Mwenyonii		W.G.Y.Y								
CMhaemolamae								Y		Y
Mhaemofelis	WW	T		C		G		Y		
Mhaemocanis		T		C		G				
Mhaemurris		T	T	T	A					A
CMturicensis		T	T		Y		G	R		A
Mcocoides		T	T		C		G			A
Mparvum										
Msuis										

```

          1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CMhaemominutum CTTAATTCGATAATACACGAAAAACCTTACCAGGCTTGWAATCTTYTGCRAAGCTATAGAAATATAGTGRAGGYTATCARAATGACAGGTGGTGCATGG
CMhaemoparvum .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Movis .....R.....A.....T.....A.....A.....G.....TA.....T.A.....
Mwenyonii .....M.....A.....Y.....A.....W.....T.A.....R
CMhaemolamae .....C.....A.....A.....R.....G.T.....
Mhaemofelis .....A.T.C.CC.C.....R.....G.GG.....
Mhaemocanis .....A.T.C.CC.C.....R.....G.GG.....
Mhaemuris .....C.....A.AT.C.CC.....T.....A.....GG.....
CMturicensis .....A.Y.C.Y.....Y.....R.....R.....R.....
Mcocoides .....G.....A.T.C.CC.C.....A.C.....G.C.....G.GG.....
Mparvum .....W.....C.....C.C.C.C.....T.....T.....G.G.....
Msuis .....W.HM.....C.....R.....C.....Y.Y.....M.....K.....K.....R.R.....

```

```

          1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CMhaemominutum CTGTCGTCAGCTCGTGTCTTGAGATGTTTGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTWCTCTTTAGTTAAWTAGTTCTAAAGWGACTGAATCGTAAGATA
CMhaemoparvum .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Movis .....W.....KK...K.....C.....CC.....G.....
Mwenyonii .....Y.....C.....CY.R.....G.....
CMhaemolamae .....C.....C.....G.....G.....
Mhaemofelis .....C.....C.....C.K--.....C.CA..TG..
Mhaemocanis .....C.....C.....Y.....C.G--.....C.CA..TG..
Mhaemuris .....A.....C.....T.A.....C.T--.....CA..TG..
CMturicensis T.....A.....C.....RH.K--.....CA..TG..
Mcocoides T.....A.....C.....C.TA--.....CA..TG..
Mparvum .....TA.....GC.....TA.....C
Msuis .....R.....WTA.....GY.....TA.....R.....C

```



```

          1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CMhaemominutum AATGCGTTCCAGGTCCTTGACACACCCGCCCGTCAAACTATGGGAGAAA GTACTAGTTGAAACCGTATTWAATTACGCTCTAGATTGG-TAATTTTGRCT
CMhaemoparvum  ...A.....AA.....C.....T.....
Movis          ...WA.....AA.....TC.....CA.....C.....C.....GT.....T.....
Mwenyonii     ...A.....YAA.....YCA.....AC.....YR.....GT.....T.....
CMhaemolamae  ...A.....RS.....AA.....A.....C.....G.....T.....
Mhaemofelis   ...C.....A.....G.....G-TGGGC.....T.....A.....ATAC.....C.....T.....GTA.....G.....ATAC.....C.....T.....
Mhaemocanis   ...C.....A.....G.....G-TGGGC.....T.....A.....ATAC.....T.....GTA.....G.....A-AC.....C.....T.....
Mhaemuris     ...A.....A.....GG.....AGGC.....T.....C.....A.....C.....C.....T.....G.....A.....A-ATT.....CC.....T.....
CMturicensis  ...A.....A.....G.....GRGC.....T.....R.....A.....AY.....M.....GT.....A.....A.....A-A.....C.....C.....R.....KK.....
Mcocoides     ...A.....A.....GG.....GGAC.....T.....A.....ATA.....T.....TA.....A.....A-ATC.....CC.....T.....
Mparvum       ...A.....C.....AA.....A.....A.....T.....TA.....A.....A-ATC.....CC.....T.....
Msuis         ...A.....S.....C.....AA.....A.....A.....T.....

```

```

          1510      1520      1530      1540      1550      1560
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CMhaemominutum GGAGTTAAGTCGTAACAAGGTAKCGGATCCGCG-----
CMhaemoparvum  .....A.....C-----
Movis          .....A.....C-----
Mwenyonii     .....S-----
CMhaemolamae  .....-----
Mhaemofelis   .....KR.....S.....S.....WW.....SMSRACGTGCGGGTGGATAATC-----
Mhaemocanis   .....M.....R.....KWMS.....KAYSMGMRMRKGS.....GGTGGATAATCTTCAAATTACGAGATG-----
Mhaemuris     .....-----
CMturicensis  .....SRRW.....TC-----
Mcocoides     .....-----
Mparvum       .....S.....S.....WW.....SRSRACGTGCGGGTGGATAACT-----
Msuis         .....RWRRYVYMRWRMR.....GAACGTGCGGGTGGATAACTT-----

```

Anexo1. Alineamiento múltiple de secuencias consenso de las especies de micoplasmas hemotróficos. El alineamiento fue realizado con el programa ClustalX. Los puntos de colores representan la identidad de secuencia con respecto al consenso de '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (CMhaemominutum) tomada como referencia. Junto con las secuencias se alinearon los dos pares de primers específicos para *M. suis*-*M. parvum* (MSuis-EP1-F, MSuis-EP1-R, MSuis-EP2-F, MSuis-EP2-R) sombreados en color amarillo y los primers universales para micoplasmas hemotróficos (MHemo-EP1-F, MHemo-EP1-R, MHemo-EP2-F, MHemo-EP2-R) sombreados en celeste. Los códigos de nucleótidos según la IUPAC se detallan en la Tabla 5.

Anexo 2 - Protocolos de PCR

- Extracción de ADN

Los protocolos que se utilizaron para la extracción de ADN fueron: A) Extracción de ADN con sílica y B) DNAzol de Invitrogen®.

A) Protocolo de Extracción de ADN con sílica (óxido de sílice)

- 1) 300 µl de sangre con anticoagulante EDTA + 500 µl de buffer de extracción.
- 2) Centrifugar 5 min a 14.000 g
- 3) Pasar la mayor cantidad posible del sobrenadante a un tubo eppendorf de 1,5 ml con 500 µl de buffer de extracción.
- 4) Agregar 15 ml de suspensión de sílica. Vortear e incubar 10 min a temperatura ambiente con agitación ocasional.
- 5) Centrifugar menos de 1 seg a 2.000 g y descartar luego el sobrenadante.
- 6) Agregar 500 µl de la solución de lavado. Resuspender completamente el precipitado y centrifugar 1 seg a 2.000 g. Descartar el sobrenadante.
- 7) De la misma forma realizar otros 2 lavados, con la solución de lavado.
- 8) De la misma forma realizar 2 lavados con 500 µl de etanol 70%.
- 9) De la misma forma realizar un lavado con 500 µl de acetona. Vortear, centrifugar y retirar el sobrenadante.
- 10) Secar en la estufa a 56°C durante 5 min.
- 11) Agregar 50 µl de agua bidestilada (o TE), vortear e incubar 10 min a 56°C.
- 12) Centrifugar 1 min a 14.000 g, pasar el sobrenadante a otro tubo eppendorf, evitando tomar la sílica ya que interfiere con la reacción de PCR.

B) Protocolo de purificación con DNAzol

- 1) Colocar en un tubo eppendorf 1ml de reactivo DNAzol (Tiocianato de guanidina) + 100 µl de sangre con anticoagulante.
- 2) Homogeneizar por inversión a temperatura ambiente durante 5 min.
- 3) Centrifugar a 10.000 g durante 5 min.
- 4) Colocar el sobrenadante con cuidado en otro tubo eppendorf.
- 5) Agregar 500 µl de etanol absoluto, homogeneizar y dejar incubar por 3 min a temperatura ambiente.
- 6) Centrifugar a 10.000 g durante 5 min. Eliminar el sobrenadante.
- 7) Lavar el pellet con 100 µl de etanol 70%.
- 8) Vortear unos 1-2 min.
- 9) Centrifugar a 10.000 g durante 5 min.
- 10) Descartar el sobrenadante y repetir los pasos 7) 8) y 9).
- 11) Dejar destapado hasta que se evapore el resto del etanol aproximadamente 5-10 min a temperatura ambiente.
- 12) Agregar 50 µl de NaOH 8mM.
- 13) Colocar los tubos eppendorf en BT a 37°C e incubar toda la noche.
- 14) Medir la concentración de ADN.

Luego de la obtención del ADN por cualquiera de los dos métodos se procedió a medir la concentración y evaluar la calidad del mismo en un espectrofotómetro NanoVue™ (GE Healthcare). La concentración se calculo en base a la absorbancia a 260 nm. La calidad se evaluó de acuerdo a la relación 260/280 nm, considerando que el ADN es de buena calidad y libre de contaminantes cuando los valores son

iguales o mayores 1,7. Las muestras de ADN se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento.

- Técnica de purificación de productos de PCR por precipitación con PEG.

Travis Glenn (www.mcdb.lsa.umich.edu/labs/olsen/files/PCR.pdf).

- 1) Correr 5 µl de la PCR en un gel de agarosa para verificar la amplificación.
- 2) Al resto de la reacción de PCR agregar 50 µl de una solución de 20% PEG 2.5 M NaCl y mezclar bien.
- 3) Incubar a 37°C por 15 min.
- 4) Centrifugar a 15.000 g durante 15 min a temperatura ambiente.
- 5) Retirar el sobrenadante con pipeta y descartarlo.
- 6) Agregar 125 µl de etanol 70% suavemente por la pared del tubo, dejar reposar un min. Eliminar el sobrenadante y descartar. Eliminar la mayor cantidad posible del etanol.
- 7) Secar el pellet a 37°C durante 10-15 min.
- 8) Disolver el producto de PCR en 15 µl de agua bidestilada estéril. Resuspender completamente el pellet. Incubar unos minutos a temperatura ambiente o a 37°C.
- 9) Cuantificar en espectrofotómetro.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
PCV 2_con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PCV-2-R2   GAATTCCAACCTTAACCTTYTTATTTCTGTAGTATTCAAAGGGYAYAGWGMKKKKTTKGWSCCCCCCTCCYGGGGGAASAAAGTCRTYAAKWTTRAATCK
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
PCV 2_con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PCV 2_con  AKCATGTCCACCGCCAGGAGGGYGTKBWGACTGTRGWSSCTTGAYAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGYGTTGAAGATGCCATTTTCCTT
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
PCV 2_con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PCV 2_con  TCCARCGGTARCGGTGGCGGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGGCGGYGTCTTCKYCTBCGGWAACGCCT
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
PCV 2_con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PCV 2_con  CCTTGGRTAYGTCATABCTGAAAACGAAAGAGTGCGCTGTAAGTATTACCAGCGWCTTCGGCAGCGGCRRCACVKCGGYRGCRYWBDGCAGMAMAT
PCV-2-R1   GAAAACGAAAGAGTGCG
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
PCV 2_con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PCV 2_con  GCCMARHARRRAGARTGGAASAAGCGGMCCSCAACCMCAYAARAGGTGGGTTTCACNYTBAATTRATCCTTCCGARRASGAGMRHAASAAATACRGGAK
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
PCV 2_con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PCV 2_con  CTBCCAATMTCCCTDTTTGATTATTTTRTTKKYGGMGRGGARGGTWWKGRRGARGGNMGAACWCCYCRCCTHCAGGGGYTYGCKAAYTTTGYBAARAACK
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
PCV 2_con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PCV 2_con  ARACWTTTAYAARGTGARRTKGTATYTBGGWKYCGCTGCCAYBYGAGRAARCVARRGGAACNGAYCRGCAGAATAWAGAATAYTGYAGYAARGAAGG
      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
PCV 2_con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PCV 2_con  YMACWTACTKRTNRARTGTGGAKCTSBMGRWVBCARGGRMARCGSRRYGACYTBCTACTGCTGTGAGTACMYTKYTGGMGASSSRWSTYTGGTRRCY
      810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
PCV 2_con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PCV 2_con  GTWGCMGAGCAGYWCCTKTAACGKTTGTCARAAATWKCCGYGGGCTGKCYGAACTTTTTGAAAGYKAGCGGGARRRTGCRGMRCGYGATTGGAAGCNR
      910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
PCV 2_con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
PCV 2_con  MTGTRCACGTMRTWGTGGSBMCVCCYGRBTGTRGBRARAGYMARTGGGCYSSTARTTTYGCWGABCBKRRMRMCACMTACTGGAARCYDMSTAGAAAYAA

```

```

      1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090      1100
PCV 2_con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTGGTGGGAYGGWTAYCATGGWGAAGAAGTKGTTGTTWTKGATGAYTTTTATGGYTGGHTRCCNTGGGATGATCTACTGAGAYTSTGTGAYMGRTAYCCW

      1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
PCV 2_con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTGACTGTWGMGACTAAAGGKGGWACTGTWCCTTTTYTGCCCGCAGTATTYTGATTACSAGCAATCAGRCCCCSYWGAATGGTACYCCTCRRMTGCTG

      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280      1290      1300
PCV 2_con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCSCAGCTGTAGAAGCBCTYATMGGAGGATTACTWCYTTGSWATTTTGAAGRMTGYTRSMGARCARCSACGGAGGWAGRRGGCCRRTTYGWMRCMST

      1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
PCV 2_con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BKHCCCMCCMTGYSCYSWDTTYCCWTATRAAATAAATTACTGAGTCYTTTTTATCAYTTCGTAATGGYTTTTTRKTDTCAYTDWGRSKTTAAGTGGGGGG
PCV-2-F1
                                CYTTTTTATCAYTTCGTAATG

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500
PCV 2_con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTYTAAGATTAAATYCYCTGAATYGTACRTACAKDGTTHAYACGGATATTGTRKTCYGGTCGTWKTACYGTTTTCGARNGCRRTKCCGAGGCCTACRT

      1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
PCV 2_con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
RGTCHACATTTYYYWSHVGYTTGNAKYCTMAKCCRVAGYTGRTTYMTTTGTTRTTBGGTTGGAARTAAAYCDATNGTSSHRTCHRGNACAGGTTTBGGBY

      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
PCV 2_con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NAARTAVCKGGAGTGGTAGGRGAAGGGBTGGGKDATKGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACATAKGGGBCRTADGTEBWGGGCWKTGGMYTTWRBKAHRAAG
PCV-2-F2
                                GGGAGGAGTAGTTTACATA

      1710      1720      1730      1740      1750      1760
PCV 2_con .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTRTCATCYAGWATRAYAGCASTGGADCCHACTCCCYTRYCACCYTGNGTRATBGGGRARCAGGGCCR

```

Anexo3: Secuencias consenso de PCV-2. El alineamiento fue realizado con el programa ClustalX. Se alinearon los dos pares de primers específicos para PCV-2 (PCV-2F1, PCV-2-F2, PCV-2R1, PCV-2R2) sombreados en color verde. Los códigos de nucleótidos según la IUPAC se detallan en la Tabla 5.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis J, Krakowka S, Meehan B, Adair B. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathology*. 1999a; 121(1): 1-11.
2. Allan, GM, Mc Neilly, Meehan BM, Kennedy S, Mackie DP, Ellis JA, Clark EG, Espuna E, Saubi N, Riera P, Botner A, Charreyre CE. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol*. 1999b; 66 (2): 115-123.
3. Ambrogi A, Romanini S, Carranza A, Pelliza A, Di Cola G, Sánchez-Cordón P. Síndrome multisistémico de desmejoramiento posdestete (SMDP) en cerdos criados al aire libre en una granja situada en Argentina. *Rev Col Cienc Pec*. 2005; 18(3): 240-245.
4. Andreas Untergasser, Harm Nijveen, Xiangyu Rao, Ton Bisseling, René Geurts, and Jack A.M. Leunissen: Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3Nucleic Acids Research 2007 35: W71-W74; doi: 10.1093/nar/gkm306
5. Anziani OS, Ford CA, Tarabla HD. Eperythrozoonosis porcina en la República Argentina. *Rev Med Vet*. 1986; 67: 99-101.
6. Arauz MS, Pintos ME, Stornelli MA, Stornelli MC, Pereda R, Rodríguez Durán MF. Y col. Estudio de la prevalencia de *Eperythrozoon suis* en granjas de producción intensiva de cerdos de la provincia de Buenos Aires. XIV Reunión Científico Técnica AAVLD, PAR-03, 2002.
7. Arauz S, Acuña M, Barbera RM, Scodellaro C, Pintos ME, Stornelli MC. y col. *Mycoplasma suis* infection in lactating piglets as a cause of low weight at weaning". III Congreso Latino Americano de Suinocultura. Pork Expo 2006. Foz de Iguazú.

8. Baljer G, Heinritzi K, Wieler L. Indirect hemagglutination for Eperythrozoon suis detection in experimentally and spontaneously infected swine. Zentralbl Veterinarmed B. 1989; 36(6): 417-23.
9. Benson LA, Kar S, McLaughlin G, Ihler GM. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. Infection and Immunity. 1986; 54: 347-353.
10. Brownback A. Eperythrozoonosis as a cause of infertility in swine. Vet Med Small Anim Clin. 1981; 76(3): 375-8.
11. Campos Aquino L, Hicks C, Scalón M, Lima M, Lemos M. Prevalence and phylogenetic analysis of haemoplasmas from cats infected with multiple species. J Microbiol Met. 2014; 189-196.
12. Cappuccio JA, Quiroga MA, Machuca MA, Piñeiro PE, Arauz MS, Pintos ME, Vigo GB, Perfumo CJ. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome as a cause of death, retarded growth and increased isolation of salmonella typhimurium in grower finisher phases in three argentinean farms. 19th IPVS Copenhagen, Denmark. 2006; Vol 2. 95.
13. Cerdá RO. Micoplasmas. En: Stanchi NO Microbiología Veterinaria. Buenos Aires, Argentina. Ed. Intermédica. 2007, p. 313-317.
14. Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. Vet J. 2005; 169: 326-336.
15. Cino-Ozuma AG, Henry S, Hesse R, Nietfeld JC, Bai J, Scott HM, Rowland RR. Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. J Clin Microbiol. 2011; 49: 2012-2016.
16. Clark, EG, 1997. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: Proc Annu Meet. Am Assoc Swine Pract. 1997; 28: 3.

17. Criswell KA, Krishna G, Zielinski D, Urda GA, Theiss JC, Juneau P, Bleavins MR. Use of acridine orange in: flow cytometric evaluation of erythropoietic cytotoxicity. 1998; 414: 49-61.
18. Dietz S, Mack SL, Hoelzle K, Becker K, Jannasch C, Stadler J, Ritzmann M, Hoelzle LE. Quantitative PCR analysis of *Mycoplasma suis* shedding patterns during experimental infection. Vet Microbiol. 2014; 172: 581-585.
19. Do Nascimento NC, dos Santos AP, Chu Y, Guimaraes AMS, Pagliaro, A, Messick JB. Genome sequence of *Mycoplasma parvum* (formerly *Eperythrozoon parvum*), a diminutive hemoplasma of the pig. Genome Announc. 2013. 1: pii:e00986-13.
20. Do Nascimento NC, dos Santos AP, Chu Y, Guimaraes, AMS, Baird AN, Weil AB, Messick JB. 2014. Microscopy and genomic analysis of *Mycoplasma parvum* strain Indiana. Vet Res. 2014; 45:86.
21. Ellis J, Hassard L, Clark E. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. Can Vet J. 1998; 39: 44-51.
22. Felder KM, Hoelzle K, Heinritzi K, Ritzmann M, Hoelzle LE. Antibodies to actin in autoimmune haemolytic anaemia. BMC Vet Res. 2010; 6-18.
23. Felder KM, Hoelzle K, Ritzmann M, Kilchling T, Schiele D, Heinritzi K, Groebel K, Hoelzle LE. Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. Cellular Physiology and Biochemistry. 2011; 27: 557-564.
24. Felder KM, Carranza PM, Gehrig PM, Roschitzki B, Barkow-Oesterreicher S, Hoelzle K, Riedel K, Kube M, Hoelzle LE. Insights into the gene expression profile of uncultivable hemotrophic *Mycoplasma suis* during acute infection, obtained using proteome analysis. J Bact. 2012; 194: 1505–1514.

25. Fort M, Olvera A, Sibila M, Segalés J, Mateu E. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol.* 2007; 125 (3-4): 244-255.
26. Gagnon CA, Music N, Fontaine G, Temblay D, Harel J. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV) : a type 1 and type 2 PCV recombinant. *Vet Microbiol.* 2010; 144: 1002-1007.
27. Gaunt SD. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agent and protozoa. In Schalm`s. *Veterinary Hematology*. Ed. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. 5th Ed. 2000; 27:154-162.
28. Gava D, Morés N, Ciacci-Zanella JR, Oliveira SR. Padronização de uma técnica de imunohistoquímica (IHQ) em cortes histológicos para detecção de Circovirus Suíno tipo 2 (PCV-2) utilizando anticorpo monoclonal. *Anais 12º Congr Bras Vet Especialistas em Suínos*. Fortaleza. 2005a; p.113-114.
29. Gava D, Mores N, Ciacci-Zanella JR, Simon NL, Triques NJ, Oliveira SR. Estudo comparativo entre histopatologia, imunocitoquímica (ICQ) e imunohistoquímica (IHQ) em suínos infectados por circovírus suíno tipo 2 (PCV2). *Anais 12º Congr Bras Vet. Especialistas em Suínos*, Fortaleza. 2005c; p.119-120.
30. Giovanni F, Cortey M, Gomes de Castro AMM, Piovezan U, Szabo MPJ, Drigo M, Segalés J, Richtzenhain LJ. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. *Vet Microbiol.* 2015; 178: 158-162.
31. Gresham ACJ. *Eperythrozoon* infection in pigs. *The Pig J Proceedings*. 1996; 37:20-26.
32. Groebel K, Hoelzle K, Wittenbrink MM, Ziegler U, Hoelzle LE. *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes. *Infection and immunity*. 2009; 77(2): 576-584.

33. Guimaraes AM, Biondo AW, Lara AC, Messick JB. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four comercial pig farms in Southern Brazil. *Vet Rec.* 2007; 160(2): 50-53.
34. Guimaraes AM, Santos AP, SanMiguel P, Walter T, Timenetsky J, Messick JB. Complete genome sequence of *Mycoplasma suis* and insights into its biology and adaption to an erythrocyte niche. *PLoS ONE.* 2011a; 6, e19574.
35. Guimaraes AM, Vieira RF, Poletto R, Vemulapalli R, Santos AP, de Moraes W, Cubas ZS, Santos LC, Marchant-Forde JN, Timenetsky J, Biondo AW, Messick JB. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. *J Appl Microbiol.* 2011; 111(2): 417-25.
36. Guimaraes AMS, Santos AP, Timenetsky J, Bower LP, Strait E, Messick JB. Identification of *Mycoplasma suis* antigens and development of a multiplex microbead immunoassay. *J Vet Diag Investig.* 2014; 26(2): 203-212.
37. Gwaltney SM, Willard LLH, Oberst RD. In situ hybridizations of *Eperythrozoon suis* visualized by electron microscopy. *Vet Microbiol.* 1993; 36: 99-112.
38. Gwaltney SM. *Eperythrozoon suis* infections in pigs: Clinical syndromes and diagnosis. *Swine Health Produc.* 1995; 3: 25-27.
39. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 1999; 41: 95-98.
40. Haldar K, Mohandas N. Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Current Opinion in Hematology.* 2007; 14: 203-209.
41. Heinritzi K. Eperitrozoonosis. En: Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D (eds), *Enfermedades del Cerdo.* 8^a ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. 2000; pp 363-367.

42. Henderson JP, O'Hagan J, Hawe SM, Pratt MCH. Anaemia and low viability in pliglets infected with *Eperythrozoon suis*. *Vet Rec.* 1997; 140: 144-146.
43. Henry SC. Cinical observations on eperythrozoonosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1979; 174: 601-603.
44. Hoelzle LE, Adelt D, Hoelzle K, Heinritzi K, Wittenbrink MM. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. *Vet Microbiol.* 2003; 93: 185–196.
45. Hoelzle LE, Hoelzle K, Helbling M, Aupperle H, Schoon HA, Ritzmann M, Heinritzi K, Felder KM, Wittenbrink MM. MSG1, a surface-localised protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes. *Microbes and Infection.* 2007d. 9; 466-474.
46. Hoelzle, LE. Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. *Vet Microbiol.* 2008; 130:215-226.
47. Hoelzle K, Engels M, Kramer MM, Wittenbrink MM, Dieckmann SM, HoelzleLE. Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). *Vet Microbiol.* 2010; 143: 405-409.
48. Hoelzle LE, Zeder M, Felder KM, Hoelzle K. Pathobiology of *Mycoplasma suis*. *Vet J.* 2014; 202:20–25.
49. Hornok S, Micsutka A, Meli ML, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmiss-ion of bovine haemoplasmas. *Vet Microbiol.* 2011; 152: 411-414.
50. Hsu FS, Liu MC, Chou SM, Zachary JF, Smith AR. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Eperythrozoon suis* antibodies in swine. *Am J Vet Res.* 1992; 53(3): 352-4.

51. Hu Z, Yin J, Shen K, Kang W, Chen Q. Outbreaks of hemotropic mycoplasma infections in China. *Emerg Infect Dis.* 2009; (7): 1139-40.
52. Insarralde L, Quiroga MA, Cappuccio JA, Machuca MA, Barrales H, Alarcon LV, Perfumo CJ. Síndrome de dermatitis y nefropatía porcino. Una revisión sobre su epidemiología, patología y etiología. *Analecta Vet.* 2010; 30(2): 63-73.
53. Kaneco J, Harvey W, Bruss, M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* California, USA. 5th Ed. Academic Press 1997, p. 932
54. Kekarainen T, McCullough K, Fort M, Fossum C, Segalés J, Allan GM. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 136 (3–4): 185–193.
55. Kekarainen, T. PCV-2 immunology and viral evolution. *Proceedings 7th International Symposium in Emerging and Re-emerging Pigs Diseases (ISERPD 2015).* June 21-24, 2015. Kyoto, Japan. K4 -1.
56. Kloster A, Descarga C, Davies P, Piscitelli H, Díaz L, Zielinski G. Eperitrozoosis porcina: observaciones sobre la infección natural y experimental. *Memorias V Cong Arg Cs Vet Abs.* 1985, p. 171.
57. Krakowka S, Lairmore M, Haines D, Bratanich A, Clark E, Allan G, Konoby C, Hassard L, Meehan B, MartinK, Harding J, Kennedy S and McNeilly F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet. Diagnostic Investigation.* 1999; 11: 3-14.
58. Kreier JP y Ristic M. Genus III *Haemobartonella*; Genus IV *Eperythrozoon*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Ed. N.R. Krieg & J.G. Holt. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. 1984; 1: 724-727.

59. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0 Bioinformatics. 2007; 23(21): 2947-2948.
60. Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele, O, Wang C, Shaukat S, Masroor M, Wiñlson M, Ndjanzo J, Peeters M, Gross-Camp N, Muller M, Hahn B, Wolfe N, Triki H, Bartkus J, Zaidi S, Delwart E. Multiple diverse circovirus infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J Virol*. 2010; 84: 1647-1682.
61. Lopez-Soria S, Sibila M, Nofrarías M, Calsamiglia M, Manzanilla EG, Ramírez-Mendoza H, Mínguez A, Serrano JM, Marín O, Joisel F, Charreyre C, Segalés J. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) load in serum on average daily weight gain during the postweaning period. *Vet Microbiol*. 2014; 174: 296–301.
62. Machuca MA, Quiroga MA, Armocida AD, Arauz S, Idiart JR; Stornelli MA y col. Eperitrozoosis porcina. Descripción de un brote en la provincia de Buenos Aires. *Rev Med Vet*. 1999; 80(6): 470-474.
63. Machuca MA, Segalés J, Idiar JR, Sanguinetti HR, Perfumo CJ. Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina en la Republica Argentina: patología y detección de circovirus porcino. *Rev Med Vet*. 2000; 81: 337-339.
64. Maggi RG, Compton SM, Trull CL, Mascarelli PE, Mozayeni BR, Breitschwerd EB. Infection with Hemotropic Mycoplasma Species in Patients with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(10): 3237-3241.
65. Mankertz A, Domingo M, Folch JM, LeCann P, Jestin A, Segalés J, Chmielewicz B, Plana-Durán J, Soike D. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res*. 2000; 66(1): 65-77.
66. Meng K, Sun W, Zhao P, Zhang L, Cai D, Cheng Z, Guo H, Liu J, Yang D, Wang S, Chai T. Development of colloidal gold-based immunochromatographic assay for rapid

- detection of *Mycoplasma suis* in porcine plasma. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014; 55: 396-399.
67. Messick JB, Berent LM, Cooper SK. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* infection in cats and differentiation using restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 462–466.
68. Messick JB, Cooper S, Huntley M. Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay using the 16r RNA gene for detection of *Eperythrozoon suis* infection. *J Vet Diagn Invest*. 1999; 11: 229-236.
69. Messick JB. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol*. 2004; 33(1):2-13.
70. Messick JB, Santos AP, Guimaraes AMS. Complete Genome Sequences of Two Hemotropic Mycoplasmas, *Mycoplasma haemofelis* Strain Ohio2 and *Mycoplasma suis* Strain Illinois. *J of Bacteriol*. 2011; p 2068-2069.
71. Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of “*Candidatus Mycoplasma haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma Haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” and “*Candidatus Mycoplasma wenyonii*”. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001; 51: 891-899.
72. Neimark H, Johansson K, Rikihisa Y, Tully J. Revision of haemotropic *Mycoplasma* species names. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 683.
73. Nieto D, Martínez-Guinó L, Jiménez-Melsió A, Segalés J, Kekarainen T. Development of an indirect ELISA assay for the detection of IgG antibodies against the ORF1 of Torque teno sus viruses 1 and 2 in conventional pigs. *Vet Microbiol*. 2015; 180(1-2): 22-7.

74. Nonaka N, Thacker BJ, Schillhorn van Veen, TW, Bull RW. In vitro maintenance of *Eperythrozoon suis*. *Vet Parasitol.* 1996; 61: 181-199.
75. Oberst RD, Gwaltney SM, Hays MP, Morgan S, Stair EL. Experimental infections and natural outbreaks of eperythrozoonosis in pigs identified by PCR-DNA hybridizations. *J Vet Diagn Invest.* 1993; 5(3): -8.
76. Oehlerking J, Kube M, Felder KM, Matter D, Wittenbrink MM, Schwarzenbach S, Kramer MM, Hoelzle K, Hoelzle LE. Complete genome sequence of the hemotrophic *Mycoplasma suis* strain KI3806. *J Bacteriol.* 2011; 193: 2369–2370.
77. Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods.* 2004; 117 (1): 75-80.
78. Olvera A, Cortey M, Segalés J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. *Virology.* 2007; 357: 175-185.
79. Opriessnig T, O'Neil K, Gerber PF, de Castro AM, Ginenéz-Lirola LG, Beach NM, Zhou L, Meng XJ, Wang C, Halbur PG. A PCV-2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a based vaccine to protect against PCV-2 b or combined PCV-2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV-2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine.* 2013; 31(3): 487-94.
80. Pereda A, Piñeyro P, Bratanich A, Quiroga MA, Bucafusco D, Craig MI, Cappuccio J, Machuca M, Rimondi A, Dibárbora M, Sanguinetti HR, Perfumo CJ. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 from pigs with porcine circovirus associated diseases in Argentina. *Veterinary Science.* doi: 10.5402/2011/560905.
81. Pereyra N, Cane F, Pereyra M. Peste Porcina Clásica: incidencia y formas clínicas de presentación. *Rev Med Vet.* 1990; 71: 214-218.

82. Pereyra N, Messick J, Cane F, Pereda A, Blum M, Guglielmone A. Prevalencia de la infección por el hemoplasma *Mycoplasma suis* en Argentina. Memorias del XIX Congreso Panamericano de Veterinaria, 2004.
83. Pereyra N, Sarradell J, Cane F, Francois S, Pidone C, Comba E, Rodríguez F, Guglielmone A. Detección de *Mycoplasma suis* en Casos clínicos con el Síndrome del Desmedro Multisistémico Postdestete en Porcinos. Rev Arg Microbiol. 2006; 38: 130-133.
84. Pereyra NB. Aspectos clínicos, epidemiológicos y terapéuticos de la hemoplasmosis (eperitrozoonosis) porcina. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 2009.
85. Pereyra NB, Pérez AM, Messick JB, Cane FD, Guglielmone AA. Estudio de factores de riesgo asociados a la infección por *Mycoplasma suis*. In Vet. 2010; 12(2): 121-130.
86. Pereyra NB, Pérez AM, Messick JB, Cane FD, Guglielmone AA. Estimación de la sensibilidad y especificidad de dos pruebas diagnósticas para la detección de *Mycoplasma suis* en Argentina utilizando un modelo bayesiano. Rev Med Vet. 2011; 43: 117-125.
87. Pintos ME, Stornelli MC, Scodellaro CF, Stornelli MA, Arauz MS. Anemias arregenerativas en felinos y caninos: Revisión bibliográfica II parte. Vet Cuyana. 2006; 1(2): 5-11.
88. Pintos ME, Fauret NM, Posik DM, Diez M, Allende M, Cappuccio J, Scodellaro CF, Perfumo CJ, Arauz MS. Estudio de las variaciones hematológicas, bioquímicas y de PCR, en cerdos esplenectomizados provenientes de una granja con antecedentes de *Mycoplasma suis*." XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. FCV-UNR. Jornada Latinoamericana. 2013 Presentación poster oral.

89. Portiansky EL, Quiroga MA, Machuca MA, Perfumo CJ. *Mycoplasma suis* in naturally infected pigs: an ultrastructural and morphometric study. *Pesq Vet Bras.* 2004; 24(1): 1-5.
90. Pospichil A. & Hoffmann R. *Eperythrozoon suis* in naturally infected pigs: a light and electron microscopic study. *Vet Pathol.* 1982; 19: 651-657.
91. Quintana J, Segalés J, Rosell C, Calsamiglia M, Rodríguez-Arrijo GM, Chianini F, Folch JM, Maldonado J, Canal M, Plana-Durán J, Domingo M. Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec.* 2001; 149: 357-361.
92. Rikihisa Y, Kawahara M, Wen B, Kociba G, Fuerst P, Kawamori F, et al. Western Immunoblot Analysis of *Haemobartonella muris* and Comparison of 16S, rRNA Gene Sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 823-829.
93. Ritzmann M, Grimm J, Heinritzi K, Hoelzle K, Hoelzle LE. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. *Vet Microbiol.* 2009; 133: 84-91.
94. Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arrijo GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol.* 1999; 120: 59-78.
95. Sarradel J, Pérez AM, Comba E, Pereyra N, Anthony L, Andrada M, Segalés J. Hallazgos patológicos en cerdos afectados con el síndrome del desmedro multisistémico postdestete de la República Argentina. *Rev Arg Microbiol.* 2004; 36: 118-124.

96. Schreiner SA, Hoelzle K, Hofmann-Lehmann R, Hamburger A, Wittenbrink, MM, Kramer, MM, Sokoli A, Felder KM, Groebel K, Hoelzle LE. Nanotransformation of the haemotrophic *Mycoplasma suis* during in vitro cultivation attempts using modified cell free mycoplasma media. *Vet Microbiol.* 2012a; 160: 227-232.
97. Schreiner SA, Sokoli A, Felder KM, Wittenbrink MM, Schwarzenbach S, Guhl B, Hoelzle K, Hoelzle LE. The surface-localised α -enolase of *Mycoplasma suis* is an adhesion protein. *Vet Microbiol.* 2012b; 156:88-95.
98. Scodellaro CF, Pintos ME, Stornelli MC, Arauz MS. Anemias regenerativas en caninos y felinos: Revisión bibliográfica I parte. *Vet Cuyana.* 2006; 1(1): 22-28.
99. Segalés J, Piella J, Marco E, Mateu-de-Antonio EM, Espuña E, Domingo M. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Vet Rec.* 1998 May 2; 142(18): 483-6.
100. Segalés J, Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q.* 2002; 24(3): 109-24.
101. Segalés J, Rosell C, Domingo M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol.* 2004; 98: 137-149.
102. Segalés J, Allan GM, Domingo M. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev.* 2005; 6(2): 119-42.
103. Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol.* 2005; 111: 223-229.
104. Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 2012; 164: 10-19.

105. Smith AR, Rahn T. An indirect hemagglutination test for the diagnosis of *Eperythrozoon suis* infection in swine. *Am J Vet Res.* 1975; 36: 1319-1321.
106. Smith A. *Eperythrozoonosis*. B Straw, WL Mengeling, S D'Allaire, DJ Taylor, eds. Ames: Iowa State University Press, In *Diseases of Swine*, 7th ed 1992; 470-474.
107. Sokoli A, Groebel K, Hoelzle K, Amselgruber WM, Mateos JM, Schneider MKJ, Ziegler U, Felder KM, Hoelzle LE. *Mycoplasma suis* infection results endothelial cell damage and activation: New insight into the cell tropism and pathogenicity of hemotropic mycoplasma. *Vet Res.* 2013; 44: 6-28.
108. Song Q, Zhanga W, Songa W, Liu Z, Khana MK, Hea L, Fanga R, Lic P, Zhou Y, Hua M, Zhaoa J. Seroprevalence and risk factors of *Mycoplasma suis* infection in pig farms in central China. *Preventive Vet Med.* 2014; 117: 215–221.
109. Splitter EJ. *Eperythrozoon suis* n. sp. and *Eperythrozoon parvum* n. sp., two new blood parasites of swine. *Science.* 1950; 111: 513-514.
110. Splitter EJ, Castro E. Antibiotic therapy in acute Eperythrozoonosis of swine. *J Am Vet Med Assoc.* 1957; 131: 293-294.
111. Stadler J, Jannasch C, Mack SL, Dietz S, Zöls S, Ritzmann M, Hoelzle K, Hoelzle LE. Clinical and haematological characterisation of *Mycoplasma suis* infections in splenectomised and non-splenectomised pigs. *Vet Microbiol.* 2014; 172: 294–300.
112. Strait EL, Hawkins PA, Wilson WD. Dysgalactia associated with *Mycoplasma suis* infection in a sow herd. *J Am Vet Med Assoc.* 2012; 241: 1666-1667.
113. Sykes JE, Lindsay LL, Maggi RG, Breitschwerdt EB. Human Coinfection with *Bartonella henselae* and Two Hemotropic *Mycoplasma* Variants Resembling *Mycoplasma ovis*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(10): 3782-3785.

114. Sykes JE. Feline Hemotropic Mycoplasmas. *Vet Clin Small Anim* 40. 2010; 1157-1170.
115. Teixeira TF, Cibulski SP, dos Santos HF, Wendlant A, de Sales LimaFE, Schmidt C, Franco AC, Roehe PM. Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) viral loads in serum of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and healthy pigs in Brazil. *Res in Vet Science*. 2015; 101: 38-41.
116. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA. . A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*. 1982; 295: 64-66.
117. Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol*. 1986; 91(3-4): 271-6.
118. Travis G. PEG Precipitation of PCR products. www.mcdb.lsa.umich.PCR.pdf.
119. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts René, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35: W71-W74.
120. Vieira y col. Molecular investigation of hemotropic mycoplasmas in human beings, dogs and horses in a rural settlement in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015; 57(4): 353-357.
121. Watanabe Y, Fujihara M, Obara H, Nagai K, Harasawa, R. Two genetic clusters in swine hemoplasmas revealed by analyses of the 16S rRNA and RNase P RNA genes. *J Vet Med Sci*. 2011; 73: 1657-1661.
122. Watanabe Y, Fujihara M, Suzuki J, Sasaoka F, Nagai K, Harasawa R. Prevalence of Swine Hemoplasmas Revealed by Real-Time PCR Using 16S rRNA Gene Primers. *J Vet Med Sci*. 2012; 74(10): 1315–1318.

123. Weissenbacher-Lang C, Volglmayr T, Wawenecker F, Hofstetter U, Weissenböck H, Hoelzle K, Hoelzle LE, Welle M, Ogris M, Bruns G, Ritzmann M. Porcine ear necrosis syndrome: a preliminary investigation of putative infectious agents in piglets and mycotoxins in feed. *J Vet.* 2012; 194(3): 392-7.
124. Willi B, Boretti F, Cattori V, Tasker S, Meli M. Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 2005; p. 2581-2585.
125. Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Tasker S, Wenger B, Cattori V, Meli ML. Prevalence, Risk Factor Analysis, and Follow-Up of Infections Caused by Three Feline Hemoplasma Species in Cats in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(3): 961-969.
126. Willi B, Boretti FS, Tasker S, Meli ML, Wengi N, Reusch CE, y col. From Haemobartonella to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. *Vet Microbiol.* 2007; 125: 197-209.
127. Young MG, Cunningham GL, Sanford SE. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. *J Swine Health Prod.* 2011; 19,6.
128. Yuan CL, Liang AB, Yao CB, Yang ZB, Zhu JG, Cui L, Yu F, Zhu NY, Yang XW, Hua XG. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. *Am J Vet Res.* 2009; 70(7): 890–894.
129. Zachary JF, Smith AR. Experimental porcine eperythrozoonosis T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. *Am J Vet Res.* 1985; 46: 821-830.

130. Zhai SL, Chen SN, Xu ZH; Tang MH, Wang FG, Li XJ, Sun BB, Deng SF, Hu J, Lv DH, Wen XH, Yuan J, Luo ML, Wei WK. Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control. *J Virol.* 2014; 11: 1-13.
131. Zhang CY, Li YF , Jiang P, Chen W. Use of MSG1 protein in a novel blocking ELISA for the detection of *Mycoplasma suis* infection. *J Vet.* 2012; 193: 535-538.
132. Zhe Hu, Jigang Y, Kefei S, Wei K, Qijun C. Outbreaks of Hemotropic Mycoplasma Infections in China. *Emerging Infectious Diseases.* 2009; DOI: 10.3201/eid1507.090174.
133. Zinn GM, Jesse GW, Dobson AW. Effect of eperythrozoonosis on sow productivity. *J Am Vet Med Assoc.* 1983; 182: 369-371.
134. Zulty JC, Kociba GJ. Cold agglutinins in cats with haemobartonellosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1990; 196(6): 907-10.