

Transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una granja con separaciones abiertas o sólidas determinada por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa

Transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a farm with solid or open pen partitions determined by polymerase chain reaction test

Montserrat Torremorell* Carlos Pijoan** Álvaro Ruiz*** Susana Mendoza†

Abstract

The dynamics of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* are described in a conventional nursery fitted with two different pen partition designs (open vs. solid), as variables that influence the spread of this organism. This study was conducted in a farm known to be *M. hyopneumoniae* positive with a 50% prevalence of PCR positive pigs at weaning. This farm had two nursery rooms (6 pens/room): one room was left with the original open pen partitions; pens in the other room were modified by installing solid partitions using washable plywood. In addition, two groups of pigs (16 pigs/group) were purchased from a *M. hyopneumoniae* negative farm (test pigs) and placed in alternate pens in the nursery rooms (2 pens/room). The rest of the pens were filled with pigs from the home farm (10 pigs/pen). Test pigs and two homegrown pigs from each pen were sampled throughout the nursery period by nasal swabbing; blood samples were also taken. The nasal swabs were then analyzed by nested-PCR and the blood samples by the tween-ELISA. Results revealed no statistical differences in *M. hyopneumoniae* transmission between groups housed either in the open or solid pen partitions rooms. Results also showed that *M. hyopneumoniae* was transmitted slowly within the nursery rooms up to a point where a sudden increase of infection occurred. Transmission of *M. hyopneumoniae* in confined nursery rooms is not affected by pen partition design. Transmission between infected and control pigs appears to be affected by factors that influence microbial shedding. PCR proved to be a useful tool to detect the transmission of *M. hyopneumoniae* in the lactation rooms of the farms.

Key words: PIG, *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*, UNIDADES, PCR.

Resumen

Se describe la dinámica de transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una unidad convencional con dos diferentes divisiones (abierta y cerrada) como variables que influyen en la distribución del organismo. El estudio se llevó a cabo en una granja donde se tenía conocimiento de que habría 50% de prevalencia de *M. Hyopneumoniae* en cerdos al destete positivos a PCR. Esta granja cuenta con dos salas de lactancia (6 corrales/sala), una sala se utilizó con separaciones abiertas. La otra sala tuvo una modificación para instalar separaciones sólidas de material lavable. Se adquirieron dieciséis cerdos de una granja negativa a *M. hyopneumoniae* y se utilizaron como cerdos testigo, los cuales se ubicaron alternados en la sala de lactancia (dos corrales/sala). El resto de las unidades se ocuparon con cerdos de la propia granja (diez cerdos/unidad). De los cerdos testigo y de dos cerdos de la propia granja de cada corral, se tomaron muestras con un hisopo nasal estéril en el periodo de destete y también muestras sanguíneas. Los hisopos nasales fueron analizados por la PCR-anidada y la serología se realizó con la prueba de ELISA-tween 20. Los resultados revelaron que no hay diferencia estadística en la transmisión de *M. hyopneumoniae* entre los grupos de separaciones abiertas y sólidas. Se demostró que *M. hyopneumoniae* fue transmitido lentamente entre las salas de lactancia hasta el punto donde repentinamente la infección se incrementó. La transmisión de *M. hyopneumoniae* estaba confinada a las salas de destete y no fue afectada por el diseño de las separaciones. La transmisión entre cerdos infectados y los testigos parece que se debió a la distribución microbiana. La PCR probó ser una herramienta útil para detectar la transmisión de *M. hyopneumoniae* en las salas de lactancia de las granjas.

Palabras clave: CERDO, *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*, UNIDADES, PCR.

Recibido el 14 de abril del 2005 y aceptado el 28 de octubre de 2005.

*Sygen International/Pig Improvement Company, 3033 Nashville Rd., Franklin, Kentucky.

**Clinical and Population Sciences, University of Minnesota, room 385, 1988 Fitch Ave, St. Paul, MN 55108.

***Universidad de Concepción, Facultad de Medicina Veterinaria, Av. Vicente Méndez 595, Chillan, Chile.

†Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 222, CP 54700, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, Correspondencia: Dra. Susana Mendoza, Tel. 56232058, Correo electrónico: seme@servidor.unam.mx

Introduction

During the last years, there has been an increment in diagnostic techniques based on the use of PCR (polymerase chain reaction). This test has the capacity to rapidly amplify a DNA chain, it is a sensible and specific technique and the site which is being amplified offers advantages over the traditional diagnostic techniques, since the detected microorganism does not need to be previously cultivated or alive, because it only requires the presence of DNA.¹ The PCR technique which has been described for the specific identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* is the one called nested PCR² and constituted an important advance for the diagnosis of enzootic pneumonia of pigs, since the *M. hyopneumoniae* is one of the microorganisms most difficult to grow in laboratory out of pneumonic lesions.^{3,4} The diagnosis of *M. hyopneumoniae*'s infection is performed in clinical samples or indirectly by means of serology, immunofluorescence and histopathology.⁵ Several scientists developed the nested PCR technique in order to improve this test's sensibility. These techniques have been adequately applied for the detection of *M. hyopneumoniae* by using nasal swabs^{2,3} on live pigs, as well as the detection of this microorganism in air samples.⁴

The studies of *M. hyopneumoniae*'s transmission had been scarce due to the mentioned limitations. The majority of the published studies are based on retrospective epidemiological analysis.⁶⁻⁹ Nevertheless, there are still many questions to be answered about its transmission. A scientific group stated that the velocity of transmission of this microorganism in the nursery rooms can be a predisposal factor for the pigs to eventually develop the disease.^{10,11} The designs of nursery rooms could influence in the infection's velocity; therefore, they could also reverberate in the severity of the clinical lesions. The weaning pen partitions are not less important; these can be closed or opened and could increase or decrease the transmission among the unites. In this sense, the transmission of *M. hyopneumoniae* can also happen through sprays or other mechanisms which could be affected by the design of the pen partitions. The objective of this study is to describe the transmission of *M. hyopneumoniae* in the weaning room of a conventional farm and evaluate the impact that the open or close partitions can present in the transmission of this microorganism by means of the PCR test.

Materials and methods

Animals from the University of Minnesota's farm were

Introducción

Durante los últimos años ha habido un aumento en las técnicas de diagnóstico basadas en el uso de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la prueba tiene la capacidad de amplificar rápidamente una cadena de ADN, además de que es una técnica muy sensible y específica, y que la región que se está amplificando ofrece ventajas sobre las técnicas de diagnóstico tradicionales, puesto que el microorganismo que se detecta no necesita ser cultivado previamente o estar vivo, debido a que solamente se requiere la presencia del ADN.¹ La técnica de PCR que se ha descrito para la identificación específica de *Mycoplasma hyopneumoniae* es la llamada PCR anidada² y constituyó un avance importante para el diagnóstico de la neumonía enzootica de los cerdos, debido a que *M. hyopneumoniae* es de los microorganismos de difícil crecimiento en el laboratorio a partir de lesiones neumónicas.^{3,4} El diagnóstico de la infección de *M. hyopneumoniae* se realiza en muestras clínicas o indirectamente mediante la serología, inmunofluorescencia e histopatología.⁵ Varios investigadores desarrollaron la técnica de PCR anidada con el fin de mejorar la sensibilidad de esta prueba. Estas técnicas se han aplicado adecuadamente en la detección de *M. hyopneumoniae* con hisopos nasales^{2,3} en cerdos vivos, así como la detección de este microorganismo en muestras de aire.⁴

Los estudios de la transmisión de *M. hyopneumoniae* habían sido muy escasos debido a las limitaciones ya mencionadas. La mayoría de los estudios publicados se basan en análisis epidemiológico retrospectivo.⁶⁻⁹ Sin embargo, todavía existen muchas preguntas referentes a su transmisión que necesitan ser clarificadas. Un grupo de investigación planteó que la velocidad de la transmisión de este microorganismo en las salas de lactancia puede ser un factor de predisposición para que los cerdos desarrollen posteriormente la enfermedad.^{10,11} Los diseños en lactancia podrían influir en la velocidad de la infección y, por tanto, también podrían repercutir en la severidad de las lesiones clínicas. Las separaciones de las salas de destete son igualmente importantes; éstas pueden ser abiertas o cerradas y podrían aumentar o decrecer la transmisión entre las unidades. En este contexto, la transmisión de *M. hyopneumoniae* puede suceder también a través de aerosoles u otros mecanismos que podrían ser afectados por el diseño de las separaciones. El objetivo de este estudio es describir la transmisión de *M. hyopneumoniae* en la sala de destete de una granja convencional y evaluar el impacto que las separaciones abiertas o cerradas puedan tener en la transmisión de este microorganismo, por medio de la prueba de PCR.

used for this study. A sampling with nasal swabs was performed on a weaning group of animals, in order to obtain an estimated prevalence of *M. hyopneumoniae* infection during this stage. Based on the results of this preliminary sampling, this farm was selected for this study. The farm presented 50% prevalence for *M. hyopneumoniae* infection at weaning at 21 to 28 days of age, what insured the presence of *M. hyopneumoniae* in the weaning room and a high risk of contaminating negative pigs. The farm was a one site unit of 200 sows with an all in-all out weaning system.

The sows were batch farrowed in group every three weeks and the pigs were weaned at 24 days of age. In another farm utilized as a source of negative *M. hyopneumoniae* pigs and serologically controlled against *M. hyopneumoniae* since their arrival, the animals have obtained constantly negative results. Pigs from this farm did not showed any clinical signs of respiratory problems during the nursery and final stages, for which they were considered as free (negative) from *M. hyopneumoniae* infection.

The studied farm had two weaning rooms with six units (1.5 m × 1.5 m) in each room. The piglets remained there during 19 days and then were transferred to the growth stage. Both weaning rooms were used for this study. The original design of these weaning rooms was provided with mechanical ventilation by means of a distributor air tube which went through all the units.

The weaning pens consisted of open partitions between them and the floors were built with screen. One of the rooms, the left one, as seen in Figure 1, remained with the original design and was utilized for the control animals. The pens of the other room were modified by wood with the purpose of creating solid partitions between the pens. The rest of the room was not modified and the only difference among the pens was the design of the partitions.

The animals were not experimentally defied, since they were expected to get naturally infected with *M. hyopneumoniae*. Pigs which came from the University's farm were experimental animals, while pigs obtained from the negative farm were animals called of contact. Eighty weaning pigs from the farm were distributed in two groups (40 pigs/group). These pigs were put in four of the six pens available in each site (10 pigs/pen). The rest of the pens were occupied by pigs obtained from the free *M. hyopneumoniae* farm. The units with the negative pigs were alternated with the units of the pigs from the positive farm. Sixteen pigs were obtained from the negative farm; eight of them were randomly assigned to each room and put in each pen assigned for the negative pigs (four negative pigs/pen). All negative pigs were randomly selected, as well as two pigs from the adjacent pens, which were labeled

Material y métodos

Se utilizaron animales de la granja de la Universidad de Minnesota para este estudio. Se realizó un muestreo con hisopos nasales en un grupo de animales al destete, para tener una estimación de la prevalencia de la infección por *M. hyopneumoniae* en esta etapa. Con base en los resultados de este muestreo preliminar, se seleccionó esta granja para el estudio. La granja presentó una prevalencia de 50% de cerdos positivos a *M. hyopneumoniae* en cerdos destetados de 21 a 28 días, lo que aseguró la presencia *M. hyopneumoniae* en la sala de destete y un alto riesgo para contaminar a cerdos negativos. La granja era una unidad de un solo sitio con 200 cerdas con el sistema todo dentro-todo fuera en los destetes.

Las cerdas parían en grupo cada tres semanas y los lechones eran destetados a los 24 días de edad. En otra granja utilizada como fuente de cerdos negativos a *M. hyopneumoniae* y controlada serológicamente contra *M. hyopneumoniae* desde su establecimiento, los animales han obtenido resultados negativos constantemente. Los cerdos de esta granja no mostraron ningún signo clínico de problemas respiratorios durante las etapas de lactancia y finalización; por tanto, fueron considerados negativos a la infección por *M. hyopneumoniae*.

La granja en estudio tenía dos salas de destete con seis unidades (1.5 m × 1.5 m) en cada sala. Los lechones permanecían ahí durante 19 días y después eran trasladados a la etapa de crecimiento. Ambas salas de destete fueron utilizadas para este estudio. El diseño original de estas salas de destete contaba con ventilación mecánica mediante un tubo distribuidor de aire que pasaba a través de las unidades.

Los cuartos de destete contaban con separaciones abiertas entre los corrales y los suelos eran de rejilla. Una de las salas, la de la izquierda, según la Figura 1, se quedó con el diseño original y se usó para los animales testigo. Los corrales de la otra sala fueron modificados con maderas a fin de crear separaciones sólidas entre los corrales. El resto de la sala no fue modificada y la única diferencia entre los cuartos fue el diseño de las divisiones.

Los animales no fueron desafiados experimentalmente, pues se esperaba que se infectaran naturalmente con *M. hyopneumoniae*. Los cerdos que provenían de la granja de la universidad eran cerdos de experimentación, mientras que los cerdos adquiridos de la granja negativa eran cerdos denominados de contacto. Ochenta cerdos de destete de la granja se distribuyeron en dos grupos (40 cerdos/grupo). Estos cerdos se colocaron en cuatro de los seis corrales disponibles en cada sitio (10 cerdos/corral). Los otros corrales fueron ocupados con cerdos adquiridos de

with an earring while entering to the weaning room, were sampled during the 19 days period observation and nasal swab samples were taken at the time of arrival, and 2, 6, 14 and 17 days after the study was initiated. Blood samples were taken from pigs in the weaning room at 10 and 17 days and kept under observation, in order to identify clinical signs such as cough or sneezes during the same days, although no quantitative evaluation of these signs was performed.

The nasal swabs of all the animals were analyzed for the identification of *M. hyopneumoniae* presence, by the nested PCR technique. First, samples were processed in order to extract the DNA and proceed with the PCR technique. The DNA was extracted by a conventional method using alcohol phenol: chlorophorm: isoamyl, precipitated with sodium acetate and ethanol during 30 minutes; finally, it was re-suspended in 40 µL of deionized water. The nasal swabs were suspended in 300 mL of PBS and boiled during 10 minutes. The nested PCR reaction was performed as Calsamiglia *et al.*,³ whom utilized 5 µL of the DNA preparation for the first reaction and 0.8 µL of the product for the second reaction. Amplifications were done in a reaction mixture which contained: the primers, the dntps, PCR - buffer solution, glycerol, MgCl₂ and the Taq polymerase. Both reactions were run in a thermocycler and required the same conditions, 30 cycles of the following steps: denaturalization at 94°C for 30 seconds, alignment at 60°C for 45 seconds and the extension at 72°C for 30 seconds. Each PCR reaction included: eight samples, three negative controls and one positive control. The successive procedures were constant throughout the study for all the samples of both groups of open and solid partitions. Samples of amplified - PCR were analyzed by electrophoresis in agarose gel at 1%.

M. hyopneumoniae's serology was performed at the Diagnostic Laboratory of the University of Minnesota. ELISA tween 20 test was applied, as described by Bereiter *et al.*¹²

The statistical study results were performed by logistical regression analysis, in order to compare the groups of the open and solid pens. Results were considered significant with $P < 0.05$.

Results

No clinical differences were observed among the animals located in the pens with open or solid partitions. Both groups presented some pigs that coughed at the beginning of the third week after their entrance to the nursery room. Sneezes were observed in pigs during their stay in the room mentioned, but there were no differences among the open and solid pens.

la granja negativa a *M. hyopneumoniae*. Las unidades con los cerdos negativos fueron alternadas con las unidades de los cerdos de la granja propia (positivos). Se adquirieron 16 cerdos de la granja negativa; ocho de éstos fueron asignados aleatoriamente a cada una de las salas y colocados en cada uno de los corrales asignados para los cerdos negativos (cuatro cerdos negativos/corral). Se seleccionaron aleatoriamente todos los cerdos negativos, así como dos cerdos de los corrales adyacentes, que se marcaron con un arete cuando entraron a la sala de destete, se muestrearon durante el periodo de observación de 19 días, se tomaron muestras con hisopos nasales al entrar y a los dos, seis, 14 y 17 días después de comenzar el estudio. Los cerdos fueron sangrados en la sala de destete a los diez y 17 días y se observaron para identificar signos clínicos como tos o estornudos durante los mismos días, aunque no se realizó ninguna evaluación cuantitativa de estos signos.

Los hisopos nasales de todos los animales fueron analizados para identificar presencia de *M. hyopneumoniae* por la técnica de la PCR anidada. Las muestras fueron procesadas primero para la extracción del ADN y posteriormente realizar la técnica de PCR. El ADN se extrajo por un método convencional, con alcohol fenol:cloroformo:isoamil, precipitado con el acetato de sodio y etanol por 30 minutos; finalmente fue resuspendido en 40 µL de agua desionizada. Los hisopos nasales fueron suspendidos en 300 mL de PBS y hervidos durante 10 minutos. La reacción de PCR anidada se realizó según Calsamiglia *et al.*,³ quienes usaron 5 µL de la preparación del ADN para la primera reacción y posteriormente se tomaron 0.8 µL del producto para la segunda reacción. Las amplificaciones se llevaron a cabo en una mezcla de reacción que contenía los iniciadores, los dntps, PCR-solución amortiguadora, glicerol, MgCl₂ y la Taq. polimersa. Ambas reacciones se corrieron en un termociclador y requirieron las mismas condiciones, 30 ciclos de los pasos siguientes: desnaturalización en 94°C para 30 s, alineamiento en 60°C por 45 s y la extensión en 72°C por 30 s. Cada reacción de PCR incluyó ocho muestras, tres testigos negativos y un testigo positivo. Los procedimientos seguidos fueron constantes a través del estudio para todas las muestras de ambos grupos de separaciones abiertas y sólidas. Las muestras de PCR-amplificado se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La serología para *M. hyopneumoniae* se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico de la Universidad de Minnesota. Se aplicó la prueba ELISA tween 20, como lo describen Bereiter *et al.*¹²

Los resultados del estudio estadístico se realizaron por análisis de regresión logística para la comparación entre los grupos de corral abiertos y sólidos. Los

The PCR results from the nasal swabs are shown in Table 1. At the beginning of the study, three of the pigs obtained from the supposedly negative farm gave positive results to PCR, for which serology did not detect them as negative. These pigs had been located in three different pens. Two days from their arrival, six resulted positive to PCR, but only three were positive to PCR after six days, and four at 14 days. Nevertheless, after 17 days in the nursery room, all pigs resulted positive to the PCR technique. There were no statistical differences between the number of positive PCR pigs among the contained groups in the open and solid units (p-values: 0.68; 0.07; 0.68; 0.42; 1.0 in 0, 2, 6, 14, and 17 days, respectively) (Figure 1).

The PCR results of the pigs from the main studied farm were considered as control positive (Table 1). At their entrance, six pigs resulted positive and were equally distributed among the open and solid pens. After six days in the weaning room they continued to be positive.

The results of the serologic tests showed that only two animals were positive. These pigs were initiated at 17 days in the weaning room, presented seroconversion and one of each group resulted positive.

Discussion

The PCR technique has demonstrated to be very sensitive for being used as a diagnostic tool in pigs.¹ Its use has been adapted in several diagnostic laboratories. Nevertheless, few studies have been done to determine the transmission of microorganisms with the use of this technique, specially in the transmission of *M. hyopneumoniae*. Calsamiglia *et al.*¹³ proposed the use of PCR technique to determine the transmission from sows to piglets. Stärk also recommends the use of PCR technique to determine the presence of *M. hyopneumoniae* in air samples, considering its possible use as an air transmission test.⁴

Various authors showed that the transmission of *M. hyopneumoniae* occurs mainly by direct contact of susceptible pigs with infected ones.^{14,15} The air transmission also plays an important role in the transmission of *M. hyopneumoniae* among farms, specially among SPF (Swine Pathogen Free) and conventional farms.^{6,9} The majority of these studies have not only been by observation, but also based in retrospective epidemiological data. In the past, due to the problems to cultivate this microorganism, it had been difficult to design experimental studies in the farm directed to understand how this microorganism is transmitted. Based on the results of this study and under the experimental conditions, it is inferred that *M. hyopneumoniae* was not influenced by the presence of the weaning rooms' solid units. No relevant difference

resultados se consideraron significativos con $P < 0.05$.

Resultados

No se observaron diferencias clínicas entre los animales localizados en los corrales con separaciones abiertas o sólidas. Ambos grupos tenían algunos cerdos que tosían al comienzo de la tercera semana después de la entrada a la sala de lactancia. El estornudo se observó en los cerdos durante toda su estancia en dicha sala, pero no se observaron diferencias entre los corrales abiertos y sólidos.

Los resultados de la PCR de los hisopos nasales se observan en el Cuadro 1. Tres de los cerdos adquiridos de la granja supuestamente negativa dieron resultado positivo a la PCR al principio del estudio, por lo que la serología no los detectó como negativos. Estos cerdos habían sido colocados en tres diferentes unidades. Dos días después de su entrada, seis resultaron positivos a la PCR, pero solamente tres fueron positivos a la PCR a los seis días, y cuatro a los 14 días. Sin embargo, después de 17 días en la sala de lactancia, todos los cerdos resultaron positivos con la técnica de la PCR. No se observaron diferencias estadísticas entre el número de los cerdos positivos de la PCR entre los grupos contenidos en las unidades abiertas y sólidas (p-valores: 0.68; 0.07; 0.68; 0.42, 1.0 en 0, 2, 6, 14 y 17, días, respectivamente) (Figura 1).

Los resultados de la PCR en los cerdos de la propia granja fueron considerados como testigos positivos (Cuadro 1). A su ingreso, seis cerdos resultaron ser positivos y se encontraban distribuidos igualmente entre los corrales abiertos y sólidos. Después de seis días en la sala de destete permanecieron positivos.

Los resultados de las pruebas serológicas mostraron que sólo dos animales fueron positivos. Estos cerdos comenzaron a los 17 días en la sala de destete y seroconvirtieron y uno de cada grupo resultó positivo

Discusión

La técnica PCR ha demostrado ser muy sensible para usarse como herramienta diagnóstica en cerdos.¹ Su uso se ha adaptado en muchos laboratorios de diagnóstico. Sin embargo, se han realizado pocos estudios para determinar la transmisión de microorganismos con el uso de esta técnica y en particular en la transmisión de *M. hyopneumoniae*. Calsamiglia *et al.*¹³ propusieron el uso de la técnica PCR para determinar la transmisión de cerdas a lechones. Stärk también recomendó la técnica de PCR para determinar presencia de *M. hyopneumoniae* en muestras de aire y así se dedujo su posible uso como prueba de la transmisión aérea.⁴

Varios autores demostraron que la transmisión de

| Days after entrance | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|----|-----|----|-----|----|----|-----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|--|--|--|
| 0 | | | | | 2 | | | | | 6 | | | | | 14 | | | | | 17 | | | | |
| nt | nt | nt | nt | nt | Nt | nt | nt | Nt | nt | nt | nt | nt | Nt | nt | nt | nt | nt | Nt | nt | | | | | |
| 100 ¹ | | 100 | | 100 | 50 | | 0 | | 100 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 ² | 25 | 25 | 50 | 100 | 25 | 75 | 25 | 25 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | | 0 | | 100 | 50 | | 0 | | 100 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | 0 | 25 | 25 | 100 | 25 | 50 | 0 | 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 100 | | 100 | 50 | | 100 | | 100 | | | | | | | | | | | | | | | |

Room with solid partitions

Room with open partitions

Figura 1. Cuartos de destetes experimentales. Este cuadro representa de forma esquemática el diseño de los dos cuartos utilizados para el estudio de transmisión de *Mycoplasma*. El esquema de la izquierda representa el cuarto con los corrales de particiones sólidas. El esquema de la derecha representa el cuarto con los corrales con las particiones abiertas. Los dos cuartos eran independientes.

Los cuadros ilustrados en blanco muestran el porcentaje de animales positivos a *Mycoplasma* que provienen de la granja de la universidad, la cual es positiva a *Mycoplasma*. Los porcentajes son el resultado del PCR realizado en dos de los animales muestreados (el número total de animales alojados en cada corral fue de diez animales).

Los cuadros ilustrados en gris representan los corrales que contienen los cerdos testigo o de prueba provenientes de la granja negativa a *Mycoplasma*. Los resultados muestran el porcentaje de cerdos positivos de un total de cuatro cerdos. Nt: Nt se refiere al corral presente en la granja que contenía animales positivos, pero que no fueron muestreados.

Figure 1. Experimental weaning rooms. This table represents in a schematic form the design of two rooms used for the study of *Mycoplasma*'s transmission. The sketch on the left represents a room with solid partition pens. The sketch on the right represents the room with open partition pens. Both rooms were independent.

The illustrated squares in white show the percentage of positive animals to *Mycoplasma* that come from the University's farm which is positive to *Mycoplasma*. The percentages are the result of PCR done in two of the sampled animals (the total number of lodged animals in each pen was of ten).

The gray illustrated squares represent the pens that contained the control or test pigs that came from the *Mycoplasma* negative farm. The results show the percentage of positive pigs from a total of four pigs. Nt: Nt refers to the present pen in the farm that contained positive animals, but were not sampled.

was observed among the solid versus open units and the time of infection or the percentage of infected pigs. Although there was an increment in the number of positive pigs detected by PCR in one of the samples (two days after their entrance to the nursing room) of the open unit, this was not statistically significant.

The solid partitions between the pens are sometimes used in commercial farms as a preventive measure for the microbial transmission, because they can potentially decrease direct contact contagion between the units. Nevertheless, in this study they did not have an influence in the *M. hyopneumoniae* transmission. At least for *M. hyopneumoniae*, the construction of solid partitions between the pens

M. hyopneumoniae ocurre principalmente por contacto directo de cerdos susceptibles con infectados.^{14,15} La transmisión aérea también juega un papel importante en la transmisión de *M. hyopneumoniae* entre granjas, sobre todo entre granjas SPF y convencionales.⁶⁻⁹ La mayoría de estos estudios han sido no sólo de observación, sino que también se basan en datos epidemiológicos retrospectivos. En el pasado, debido a los problemas para cultivar este microorganismo, había sido difícil diseñar estudios experimentales en la granja dirigidos al entendimiento de cómo se transmite este microorganismo. Con base en los resultados de este trabajo y bajo las condiciones de este experimento, se deduce que la transmisión de

does not seem to have any advantages. This last supported the theory that *M. hyopneumoniae* can be air transmitted, at least, in short distances or under very specific conditions. It was a surprise to find that some of the supposedly negative animals from the farm, were positive to the PCR technique. By serological and clinical studies, this farm had proven to be a negative one. Nevertheless, some months after the experiment, the farm presented clinical cases of *M. hyopneumoniae*, which suggests that the PCR technique is more sensible than the serological tests. Although the PCR technique was positive after two days of the entrance to the weaning rooms, results were not statistically different between the pens with open or solid partitions. (Figure 2) (p - value: 0.7).

The results of this study were also surprising in relation to *M. hyopneumoniae*'s transmission in the pens by means of the PCR; it seemed to be slow, although the negative pigs were in direct contact with the positive animals for more than two weeks, which suggests a broad epidemiological range of *M. hyopneumoniae* previously sustained. In general, there is the idea that *M. hyopneumoniae* is rapidly disseminated through direct contact or by spray in nearby animals. The classical presentation profile of *M. hyopneumoniae* has been observed when it comes from the outside due to bio-security faults in the farm or acquired animals with primary virus infections as is the case of PRRS virus (porcine respiratory reproductive syndrome), which stimulates the charge of *M. hyopneumoniae* in carrier animals. In this study the presence of infected animals in near contact with the uninfected animals was detected, without the evidence of transmission up to two weeks. After that period a small increase in positive animals was detected in one of the treatments, followed by an explosive infection in all pigs within all the treatments.

M. hyopneumoniae no fue influenciada por la presencia de las unidades sólidas de la sala de destete. No se observó ninguna diferencia relevante entre las unidades sólidas contra las unidades abiertas, entre el tiempo de infección o el porcentaje de cerdos infectados. Aunque había un aumento en el número de los cerdos positivos detectados por PCR en una de las muestras (dos días después de la entrada a la sala de lactancia) en la unidad abierta, este incremento no fue estadísticamente significativo.

Las separaciones sólidas entre corrales se utilizan algunas veces en granjas comerciales como medida de prevención de la transmisión microbiana, puesto que pueden disminuir potencialmente el contagio por contacto directo entre las unidades. Sin embargo, en este estudio no influyeron en la transmisión de *M. hyopneumoniae*. Por lo menos para *M. hyopneumoniae* no parece tener ninguna ventaja la construcción de divisiones sólidas entre los corrales. Esto último apoyó la visión de que *M. hyopneumoniae* puede ser transmitido vía aérea por lo menos dentro de distancias cortas o bajo condiciones muy específicas. Sorprendía encontrar que algunos animales de la granja supuestamente negativos, eran positivos con la técnica de PCR. Esta granja había demostrado ser en varias ocasiones, por estudios serológicos y clínicos, una granja negativa. Sin embargo, algunos meses después del experimento, la granja tenía casos clínicos de *M. hyopneumoniae*, por lo que se sugiere que la PCR es una técnica más sensible que la serología. Aunque la prueba de PCR fue positiva a los dos días después de la entrada en los destetes, los resultados no fueron estadísticamente diferentes entre los corrales con separaciones abiertas sólidas (Figura 2) (p-valor: 0.07).

Los resultados de este estudio también fueron sorprendentes en cuanto a la transmisión de *M. hyopneumoniae* dentro de los corrales por medio de

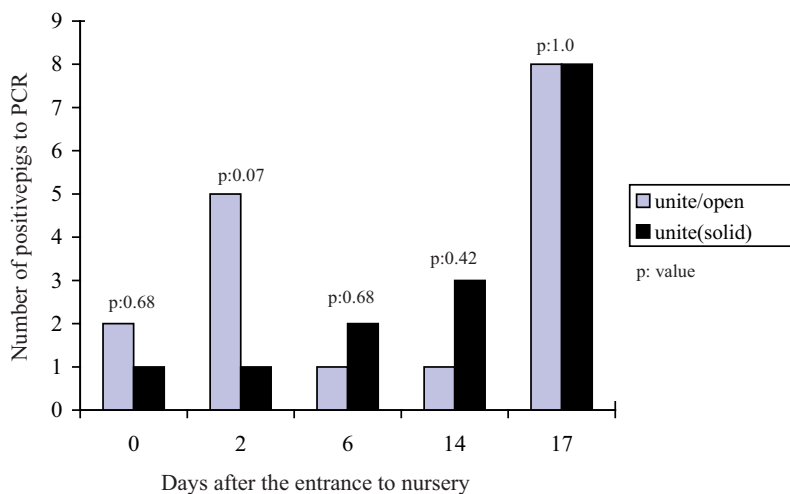


Figura 2. Resultados de la PCR positiva a *Mycoplasma hyopneumoniae* de hisopos nasales tomados durante la etapa de lactancia.

Figure 2. Results of PCR positive to *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs taken during the lactation stage.

It could be questioned that the presence of positive animals in the group of the individuals in contact invalidates the conclusions. Nevertheless, the fact that the infection occurred suddenly in all the units at the same time, without taking into account the presence or absence of positive animals, does not suggest that the partition design was responsible of this sudden distribution of *M. hyopneumoniae*.

These results suggest that the animals can be positive for PCR, stay infected for long periods and suddenly the infection can be explosive. This result can be explained due to a non-linear excretion for *M. hyopneumoniae* when the entire population is considered. It could be necessary a minimum of positive animals or a minimum of infectious charge in the pig so the animal becomes an infectious individual and excretes the microorganism, which can be a characteristic of the infection by *M. hyopneumoniae*, since this agent is a non-invasive microorganism which colonizes the surface of the respiratory epithelium. *M. hyopneumoniae* reproduces slowly and the concentration increases, until it provokes cilia destruction of the epithelium cells followed by an evident increment of its concentration.^{16,17}

This situation suggests that there is a considerable period between the infection and the disease stage, a stage which probably depends on the original infection.¹⁴ Nevertheless, for contact pigs, under natural infection conditions, it may take up to four weeks for the animals to begin coughing.¹⁴ The results here obtained confirm that, under natural conditions, the disease distributes slowly, until it reaches a plateau and then there is a fast diffusion, which suggests that the pigs can be infected at imperceptible clinical levels and the observed plateau can be a reflection of the quantity of *M. hyopneumoniae* as a consequence of being next to the infected pigs.

In this study, a PCR test was used to detect the microorganism. This is a very sensible technique, capable of finding few microorganisms. Nevertheless, it is not a quantitative test, since it only gives a positive or negative sign. This PCR disadvantage prevented to establish if there was an increase in the distribution of *M. hyopneumoniae* in infected pigs. This is an important information that should be obtained when the quantitative tests are available.

Also, it is assumed that the transmission occurs very slowly; therefore, the sudden increase in the observed positives at the end could have been the result of a contaminated sample, a characteristic commonly observed with nested PCR. Nevertheless, under the same procedures and adding three negative controls in each one of the reactions of the PCR to reduce the contamination to a minimum and

la PCR; parece ser lenta, aunque los cerdos negativos estuvieron en contacto directo con los animales positivos por más de dos semanas, lo que sugiere una gama diversa en cuanto a la epidemiología de *M. hyopneumoniae* sostenida previamente. En general, se tiene la idea de que *M. hyopneumoniae* se disemina rápidamente a través de contacto directo o por aerosoles en animales que se encuentran cercanos. El cuadro clásico de la presentación de *M. hyopneumoniae* se ha observado cuando proviene de afuera por falta de fallas en la bioseguridad de la granja, o por compra de animales que ingresan a la granja con infecciones virales primarias como el caso del virus de PRRS, que estimulan la carga de *M. hyopneumoniae* en animales portadores. En este estudio se detectó presencia de animales infectados en contacto cercano con los no infectados, sin la evidencia de la transmisión por un periodo de hasta dos semanas. Después de ese tiempo, se presentaba un pequeño aumento en animales positivos en uno de los tratamientos, seguido por la infección explosiva de todos los cerdos en todos los tratamientos.

Podría discutirse que la presencia de los animales positivos en el grupo de los animales en contacto invalida las conclusiones. Sin embargo, el hecho de que la infección ocurrió explosivamente en todas las unidades al mismo tiempo, sin importar la presencia o ausencia de animales positivos, no sugiere que el diseño de la partición fuera responsable de esta repentina distribución de *M. hyopneumoniae*.

Estos resultados sugieren que los animales pueden ser positivos por PCR y permanecer infecciosos por periodos prolongados y después la infección puede ser repentinamente explosiva. Este resultado podría explicarse por una excreción no lineal para *M. hyopneumoniae* cuando se considera entera a la población. Puede ser que se necesite un número mínimo de animales positivos o un mínimo de carga infecciosa en el cerdo para que el animal se convierta en infeccioso y excrete el microorganismo, lo que puede ser característico de la infección de *M. hyopneumoniae*, puesto que este agente es un microorganismo no invasivo que coloniza la superficie del epitelio respiratorio. El *M. hyopneumoniae* se reproduce lentamente y aumenta la concentración, hasta que causa la destrucción ciliar de las células epiteliales seguido por un aumento evidente en la concentración.^{16,17}

Esta situación sugiere que hay un espacio considerable entre la etapa de infección y de enfermedad, una etapa que probablemente dependa de la infección original.¹⁴ Sin embargo, para los cerdos de contacto, bajo condiciones de infección natural, puede tomar hasta cuatro semanas para que los animales empiecen a toser.¹⁴ Los resultados aquí obtenidos confirman que, bajo condiciones naturales, la enfermedad se distribuye lentamente, hasta que se alcanza una meseta donde hay

the variability between the samples, it is proved that the observed results are not due to problems with the technique.

During the first days of the study period, the detection of positive pigs to *M. hyopneumoniae* by PCR was inconstant. Therefore, there were pigs that were positive in two days and after mixing them they did not become positive. This result could be explained by an intermittent distribution for this microorganism, or the fact that the nasal cavity is probably only a transitory place for this agent that gives opposite results when the charge or concentration of the bacteria is very low.

In conclusion, the results of this study have emphasized some characteristics in the transmission of the *M. hyopneumoniae* which had not been previously described. Although the prevalence of positive animals to *M. hyopneumoniae* during weaning can be high, the transmission seems to be slow and does not depend on the design of the partitions between the pens. It is necessary to continue doing other studies to define the patterns of *M. hyopneumoniae*'s transmission and its relation with the infection of pigs by contact.

Acknowledgements

Special thanks to Abel Ciprián Carrasco for the technical review of this study.

Referencias

1. Mendoza S, Pijoan C, Torremorell M. The PCR as a tool for detecting respiratory microorganisms in pigs. Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress; 2000 September 17-20; Ed: Melbourne, Australia. Causal Productions Pty Ltd, 2000: 449
2. Mattsson JG, Bergström K, Wallgren P, Johansson K-E. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by *in vitro* amplification of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 1995;33:893-897.
3. Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J Vet Diagn Invest 1999;11:246-251.
4. Stärk KDC, Nicolet J, Frey J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. App Environ Microbiol 1998;64:543-548.
5. Cruz ST, Tórtora PJJ, Vega MA, Romero RA, Mendoza ESE, Ciprián CA. Cinética de la infección experimental en cerdos con *Mycoplasma hyopneumoniae* usando inmunofluorescencia. Vet Méx 2003;34:61-68.
6. Goodwin RFW. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: Search for possible causes. Vet Rec 1985;116:690-694.
7. Jorsal SE, Thomsen BL. A Cox regression analysis of risk factors related to *Mycoplasma suis* reinfection

entonces una difusión rápida, lo cual sugiere que los cerdos puedan estar infectados en niveles clínicamente imperceptibles y la meseta observada puede ser una reflexión de la cantidad de *M. hyopneumoniae* que es vertiente al lado de los cerdos infectados.

En este estudio se utilizó una prueba de PCR para detectar el organismo, ésta es una técnica muy sensible, capaz de encontrar pocos microorganismos. Sin embargo, no es una prueba cuantitativa, ya que sólo da una señal de positivo o negativo. Esta desventaja de la PCR evitó que se estableciera si había un aumento en la distribución del *M. hyopneumoniae* en los cerdos infectados. Ésta es una información importante que debiera obtenerse cuando las pruebas cuantitativas lleguen a estar disponibles.

Asimismo, se asume que la transmisión ocurre muy lentamente, entonces el aumento repentino de los positivos observados al final pudo haber sido el resultado de la contaminación de la muestra, una característica que se observa comúnmente con anidado-PCR. Sin embargo, bajo los mismos procedimientos y añadiendo tres testigos negativos en cada una de las reacciones de la PCR para reducir al mínimo la contaminación y la variabilidad entre las muestras, se comprueba que los resultados observados no se deben a problemas con la técnica.

Durante los primeros días del periodo del estudio, la detección de los cerdos positivos a *M. hyopneumoniae* por PCR era inconsistente. Así, hubo cerdos que fueron positivos en dos días y después de mezclarlos no llegaron a ser positivos. Este resultado podría explicarse por una distribución intermitente para este microorganismo, o el hecho de que la cavidad nasal es probablemente sólo un sitio transitorio para este organismo que da resultados contrarios cuando la carga o concentración de las bacterias es muy baja.

En conclusión, los resultados de este trabajo han destacado algunas características en la transmisión del *M. hyopneumoniae* que no habían sido descritas previamente. Aunque la prevalencia de los animales positivos a *M. hyopneumoniae* en el destete puede ser alto, la transmisión parece ser lenta y no depender del diseño de las divisiones entre los corrales. Es necesario seguir realizando otros estudios para definir los patrones de transmisión de *M. hyopneumoniae* y de su relación con la infección de los cerdos por contacto.

Agradecimientos

Se agradece a Abel Ciprián Carrasco la revisión técnica de este trabajo.

- in Danish SPF-herds. Acta Vet Scand 1988;Suppl 84:436-438.
8. Stärk KDC, Keller H, Eggenberger E. Risk factors for the reinfection of specific pathogen-free pig breeding herds with enzootic pneumonia. Vet Rec 1992;131:532-535.
 9. Thomsen BL, Jorsal SE, Andersen S, Preben W. The Cox regression model applied to risk factor analysis of infections in the breeding and multiplying herds in the Danish SPF system. Prev Vet Med 1992;12:287-297.
 10. Pijoan C. Diseases of high health pigs: Some ideas on pathogenesis. Proceedings of AD Leman Swine Conf; St. Paul, Minnesota. 1995 September 16-17; St. Paul, Minnesota. St. Paul, Minnesota: University of Minnesota, 1995.
 11. Halbur PG. Defining the causes of PRDC. Swine Consultant Magazines, 1996;4-15.
 12. Bereiter M, Young TF, Joo HS, Ross RF. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. Vet Microbiol 1990;25:177-192.
 13. Calsamiglia M, Pijoan C. Colonization state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. Vet Rec 2000;146:530-532.
 14. Ross RF. Mycoplasmal diseases. In: Leman A, Straw B, Mengeling W, D'Allaire S, Taylor D, editors. Diseases of Swine. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1992:537-551.
 15. Clark LK, Armstrong CH, Freeman MJ, Scheidt AB, Sands-Freeman L, Knox K. Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. Vet Med 1991;543-550.
 16. Mebus CA, Underdahl NR. Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am J Vet Res 1977;38:1249-1254.
 17. Blanchard B, Vena MM, Cavalier A, Le Lannic J, Gouranton J, Kobisch M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Mex 1992;30:329-41