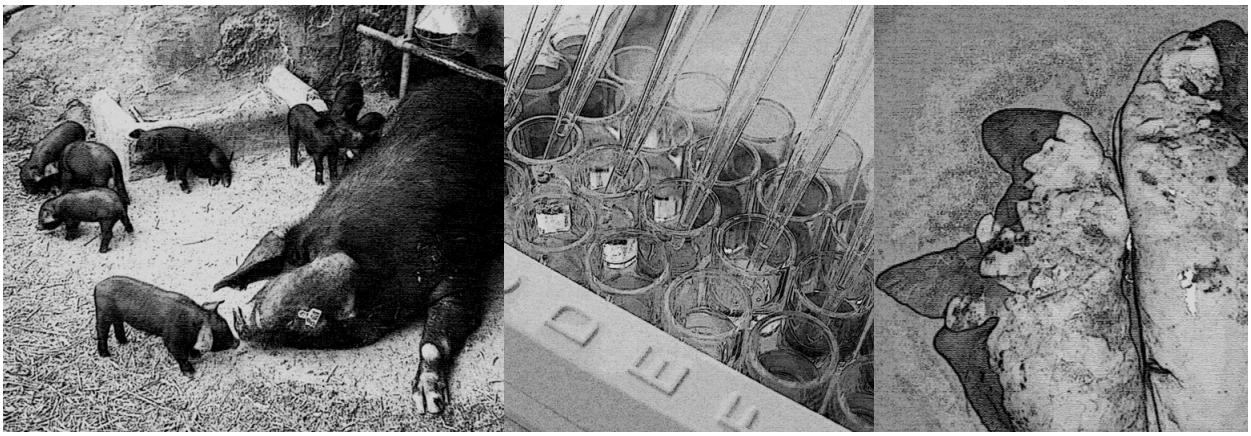
Estudio del Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas en una Raza en Peligro de Extinción: El Cerdo Negro Canario.

Tesis Doctoral Yania Paz Sánchez

ULPGC-IUSA 2015



A Iván y a mis padres.

"Todo camino, por largo que sea, comienza con un solo paso", Lao-Tse.

INDICE

Índice

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 7

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 13

2.1 RAZA PORCINA NEGRO CANARIO 13

2.1.1 Definición de la raza y antecedentes históricos 13

2.1.2 Estado actual, distribución geográfica e importancia 14

2.1.3 Aspectos morfológicos y productivos del Cerdo Negro Canario 15

2.2 APARATO RESPIRATORIO DEL PORCINO 19

2.2.1 Estructura normal del aparato respiratorio 19

2.2.2 Función del aparato respiratorio 27

2.2.3 Mecanismos de defensa del aparato respiratorio 27

2.2.4 Respuesta a la injuria en el aparato respiratorio 35

2.3 COMPLEJO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS PORCINAS (PRDC) 39

2.3.1 Etiología 40

2.3.2 Prevalencia 41

2.3.3 Patogenia 43

2.3.4 Clínica 46

2.3.5 Lesiones macroscópicas y microscópicas 47

2.3.6 Diagnóstico 50

2.4 PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL PRDC 54

2.4.1 *Mycoplasma hyopneumoniae* 54

2.4.2 Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino 70

2.4.3 Circovirus Porcino tipo 2 76

3 MATERIAL Y MÉTODOS 97

3.1 MATERIAL 99

3.1.1 Animales objeto de estudio 99

3.2 MÉTODOS 102

3.2.1 Diagnóstico anatomopatológico: diagnóstico morfológico macroscópico 102

3.2.2 Diagnóstico anatomopatológico: diagnóstico morfológico microscópico 106

3.2.3 Estudio inmunohistoquímico 108

3.2.4 Diagnóstico microbiológico 110

3.2.5 Estudio serológico 110

3.2.6 Análisis estadístico (Extractos pulmonares empleados en técnicas de ELISA) 116

4 RESULTADOS 119
4.1 ESTUDIO 1: ESTUDIO DE CAUSAS DE MUERTE (2007-2012) 119
4.1.1 Animales objeto de estudio 119
4.1.2 Descripción de lesiones macroscópicas y diagnóstico morfológico 119
4.1.3 Descripción de lesiones microscópicas y diagnóstico morfológico 137
4.1.4 Estudio inmunohistoquímico 171
4.1.5 Estudio microbiológico. 176
4.1.6 Resumen 177
4.2 ESTUDIO 2: ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO EN ANIMALES SACRIFICADOS EN MATADERO .. 179
4.2.1 Estudio macroscópico 179
4.2.2 Estudio microscópico 180
4.2.3 Estudio inmunohistoquímico 194
4.3 ESTUDIO 3: ESTUDIO DE PREVALENCIA DE MH, PRRSV Y PCV2 EN LA POBLACIÓN DE CNC 197
4.3.1 Seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 en el Archipiélago Canario 197
4.3.2 Resumen de seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 y coinfecciones observadas 206
4.3.3 Uso de extractos de tejido pulmonar en técnicas de ELISA 206
5 DISCUSIÓN 211
5.1 Antecedentes y justificación del estudio 211
5.1.1 La Raza 211
5.1.2 Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas 213
5.2 Estudio serológico 215
5.2.1 Seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 en el CNC, en el Archipiélago Canario 216
5.2.2 Serología transversal en Gran Canaria. 218
5.2.3 Serología longitudinal en Gran Canaria 219
5.2.4 Coinfección entre los distintos agentes patógenos en el Archipiélago Canario 220
5.2.5 Uso de extractos de tejido pulmonar en técnicas de ELISA 221
5.3 Estudio Anatomopatológico en animales sacrificados en matadero 223
5.3.1 Estudio anatomopatológico en pulmón 223
5.3.2 Detección de Mh, PRRSv y PCV2 mediante IHQ en tejido pulmonar 228
5.3.3 Estudio anatomopatológico complementario (órganos hemolinfoides, hígado y riñón). 230
5.4 Estudio de causas de muertes en el CNC con procesos respiratorios asociados 234
5.4.1 Casos de enfermedad asociada a PCV2. 235
5.4.2 Casos con Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino 240
5.4.3 Coinfeccion *Mycoplasma hyopneumoniae* – *Salmonella* sp. 242
5.4.4 Casos compatibles con infección por *Haemophilus parasuis.* 244

6 CONCLUSIONES 249

7 RESUMEN 253

8 SUMMARY 257

9 ABREVIATURAS 261

10 ANEXOS 265

10.1 Serología en Gran Canaria 265

10.1.1 Serología longitudinal en Gran Canaria 270

10.2 ELISA frente a Mh, PRRSv y PCV2 empleando suero sanguíneo y extracto pulmonar 271

10.3 Serología en Lanzarote 272

10.4 Serología en Tenerife 273

10.5 Serología en La Palma 274

11 AGRADECIMIENTOS 277

12 BIBLIOGRAFÍA 281

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad, el 18% de las razas domésticas de porcino reconocidas en el mundo se encuentran en peligro de extinción. A mitad del siglo pasado, el auge de los cruces comerciales con cerdos blancos, casi ocasiona la desaparición de las razas porcinas españolas autóctonas. Actualmente, se reconocen en España, 13 razas autóctonas de porcino y 10 de ellas están en **peligro de extinción**, lo que pone en evidencia la grave situación en la que se encuentran los recursos genéticos animales en nuestro país.

El **Cerdo Negro Canario (CNC)** es la única raza porcina autóctona de Canarias. Descrita por García y Capote en 1982, se cree que llegó a las islas con los aborígenes procedentes del norte de África y posteriormente sufrió cruces con razas procedentes de la Península Ibérica y de las Islas Británicas. Actualmente, se encuentra distribuida por todas las islas del Archipiélago Canario, presentando características de animales de gran rusticidad, muy bien adaptados al medio ambiente y al clima de nuestras islas.

El CNC fue reconocido oficialmente a nivel nacional en el año 1997, a través del Real Decreto 1682/1997 de actualización del Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España, siendo catalogado con la categoría de **razas porcina autóctona en peligro de extinción**, debido al reducido número de ejemplares existente en aquel momento. Con la introducción de la industria porcina en intensivo del cerdo blanco en las islas, esta raza autóctona estuvo a punto de desaparecer. Sin embargo, el censo ha aumentado considerablemente en los últimos 10 años, gracias a distintas iniciativas promovidas por los Cabildos Insulares, así como al esfuerzo de un grupo de ganaderos que han apostado por su recuperación.

La creación del Libro Genealógico (LG) y el Programa de conservación de la raza Porcina Negra Canaria, son iniciativas con las que se pretende seleccionar y preservar el estándar racial al minimizar la consanguinidad. Censos publicados en el 2014, registraron un total de 540 reproductores, de los cuales 260 hembras y 45 machos se encuentran inscritos en el Registro Auxiliar y los restantes (190 y 45) se han incluido en el Registro Definitivo. Estos animales están distribuidos por todo el archipiélago en un total de 66 explotaciones, que por lo general son de carácter familiar, criándose en semiextensivo. Al igual que ocurre en otras razas autóctonas, el CNC presenta características zootécnicas diferentes a las descritas para las razas comerciales. Sin embargo, tiene una gran importancia a nivel medioambiental y sociocultural.

Son animales que, por su rusticidad han sobrevivido en espacios muy reducidos y se han alimentado con restos orgánicos sobrantes de la alimentación humana, restos vegetales y excedentes de la ganadería, soportando a menudo raciones de escasa palatabilidad, con altas concentraciones en fibra y deficiente valor nutritivo. Este aprovechamiento sostenible de subproductos agrícolas y ganaderos hace que, el mantener a esta raza suponga un valor añadido para la economía rural, además de una disminución importante en los costes de alojamiento y alimentación, lo que se traduce en su conjunto en un importante ahorro en los costes de producción. Por otra parte, tiene un papel cada vez más importante en la gastronomía de las islas debido a las características organolépticas de su carne. Ésta se ha visto reflejado en estudios de caracterización morfométrica y morfológica de las fibras musculares del músculo longísimo lumbar, con gran valor en la predicción de la calidad y cantidad de los componentes de la carne obtenida, resultando muy apreciadas por los consumidores locales.

Un aspecto fundamental, que se debe tener en cuenta en la preservación y recuperación de una raza en peligro de extinción es el conocimiento de su **estado sanitario**. Saber qué enfermedades pueden contribuir con mayor frecuencia en la disminución del número de ejemplares causando bajas en la población o interfiriendo de forma negativa en su rendimiento productivo y reproductivo adquiere una gran importancia en estos casos.

En la industria porcina, las enfermedades respiratorias son unas de las más comunes, generando pérdidas económicas importantes en todo el mundo. Numerosos agentes patógenos bacterianos y víricos se ven involucrados en la patogénesis de estas enfermedades y juntos dan lugar al **complejo de enfermedades respiratorias porcina** (*Porcine Respiratory Disease Complex,* **PRDC**). Se trata de un síndrome multifactorial caracterizado por bajo peso, disminución en la eficacia de la conversión alimentaria, anorexia, letargia, fiebre, tos y disnea que afecta principalmente al ganado porcino entre las 14-22 semanas de edad con amplio rango de morbilidad y mortalidad.

Generalmente, en el desarrollo del PRDC se describen agentes patógenos primarios (víricos o mycoplasmas) y secundarios (bacterianos). Entre los agentes víricos más comúnmente descritos en el cerdo doméstico criado de forma intensiva, se incluyen al virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV, *porcine reproductive and respiratory syndrome virus)*, virus de influenza porcina (SIV, swine influenza virus), virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV, *Aujeszky disease virus)* y circovirus porcino tipo 2 (PCV2, *porcine circovirus type 2*), entre otros. Agentes bacterianos como *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) también se han descrito como agentes patógenos primarios en el desarrollo del PRDC. Por otro lado, bacterias como *Pasteurella multocida y Haemophilus parasuis* están descritos como agentes patógenos secundarios u oportunistas. Mh está íntimamente involucrada en la patogénesis del PRDC y algunos autores lo describen como una neumonía enzoótica, en la que participa Mh y bacterias oportunistas, agravada por virus respiratorios. La mayoría de estos patógenos también han sido detectados en animales salvajes o criados al aire libre.

Los hallazgos macroscópicos y microscópicos observados en pulmón varían mucho dependiendo de los patógenos involucrados. Con frecuencia, las lesiones pulmonares se localizan a nivel craneoventral, como áreas de consolidación, pálidas grisáceas y atelectasia, correspondiéndose con un patrón morfológico de bronconeumonía supurativa. Microscópicamente estas lesiones se caracterizan por la presencia de exudado en vías aéreas y luz alveolar, infiltrado inflamatorio peribronquial, peribronquiolar, ocasionalmente con hiperplasia del BALT, acompañadas por infiltrado inflamatorio en paredes alveolares e hiperplasia de neumocitos tipo II, correspondiéndose con una bronconeumonía y/o neumonía broncointersticial.

La presentación del PRDC es extremadamente variable entre países, regiones, sistemas de producción y explotaciones, y puede verse influenciada por las condiciones ambientales, de manejo y factores genéticos, que en conjunto condicionan la severidad del mismo. La producción del cerdo doméstico por lo general se realiza en sistemas en intensivo desarrollada en recintos cerrados, quedando expuestos a múltiples factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades respiratorias. En los animales criados al aire libre estos factores de riesgo se reducen, sin embargo los problemas respiratorios siguen existiendo. En la cría del CNC, nos encontramos con una amplia diversidad en el diseño de las instalaciones y manejo en las diferentes explotaciones. Éstas suelen desde explotaciones pequeñas, con infraestructuras muy deficientes, hasta núcleos de producción más amplios y con un mejor diseño y manejo. Esto se traduce en programas sanitarios diversos o en la mayoría de los casos, inexistentes, no realizándose programas preventivos de vacunación en estos animales frente a ningún agente etiológico.

La incidencia y prevalencia de las enfermedades respiratorias dependen del equilibrio entre la presión infectiva y la capacidad de los animales para resistir a esta presión mediante una eficiente respuesta inmunológica. En el control de las enfermedades se debe intentar eliminar o reducir la presión infectiva ejercida por los distintos agentes patógenos sobre la población, manteniendo al mismo tiempo, los mecanismos de defensa de los animales (inespecíficos, inmunológicos o inherentes al animal), siendo muy importante la identificación del desarrollo de cuadros clínicos y subclínicos. El diagnóstico definitivo y la estimación de la severidad de las enfermedades respiratorias deben basarse en la combinación de la historia clínica, evaluación de las lesiones macroscópicas y microscópicas a partir de necropsias y estudio en matadero, así como la realización de diversas técnicas laboratoriales. En estas últimas quedaría incluidas técnicas como la IHQ, para la detección de Ags de los distintos agentes etiológicos, o la serología, para la detección de Acs frente a estos patógenos.

En el CNC, el desarrollo de enfermedades respiratorias adquiere una mayor relevancia, puesto que se trata de una población que se encuentra en peligro de extinción y por tanto, el padecimiento de este tipo de enfermedades podría interferir en la recuperación de la raza. A pesar de ello, sólo existen datos aislados a partir de estudios individuales de animales remitidos para necropsia, o datos obtenidos de estudios serológicos preliminares, realizados en Gran Canaria indicando un escaso contacto de estos animales con algunos de los agentes etiológicos involucrados en el desarrollo de enfermedades respiratorias. Estos datos ponían de manifiesto la importancia de realizar estudios epidemiológicos y etiopatogénicos más completos.

Con estos antecedentes, nos planteamos, como objetivo general, **conocer la situación epidemiológica del PRDC en CNC y la participación de Mh, PRRSv y PCV2 como agentes patógenos utilizando diferentes métodos de diagnóstico.**

Para ello desarrollamos los siguientes ***objetivos específicos***:

1. Estudiar la/s causa/s de muerte en el CNC asociadas a procesos respiratorios utilizando como herramienta la Anatomía Patológica.
   A. Identificar los casos con diagnóstico morfológico macroscópico y microscópico donde se vea involucrado en aparato respiratorio.
   B. Determinar la participación de Mh, PRRSv o PCV2 en el desarrollo de dichas lesiones, mediante la realización de técnicas IHQ, estableciendo un diagnóstico etiológico.
2. Realizar un estudio anatomopatológico en tejidos de animales aparentemente sanos sacrificados en matadero.
   A. Identificar, en animales aparentemente sanos, las lesiones macroscópicas y microscópicas presentadas con mayor frecuencia en pulmón y en otros órganos por los cuales también tienen tropismo algunos de los agentes etiológicos involucrados en el PRDC.
   B. Determinar la presencia de Mh, PRRSv o PCV2 en los tejidos mediante la realización de técnicas IHQ.
3. Realizar un estudio de la seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 en la población de CNC del Archipiélago Canario
   A. Detectar la presencia de Acs frente a Mh, PRRSv y PCV2 (IgG/IgM) en la población de CNC, mediante técnicas serológicas que indiquen el posible contacto o infección de los animales por estos agentes etiológicos.
   B. Evaluar la viabilidad de los extractos de tejido pulmonar para ser empleados en la detección de Acs frente Mh, PRRSv y PCV2 (IgG/IgM) con técnicas de ELISA comerciales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 RAZA PORCINA NEGRO CANARIO

2.1.1 DEFINICIÓN DE LA RAZA Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El cerdo negro canario (CNC) es la única raza porcina autóctona del Archipiélago Canario, descrita por García y Capote (1982), en La Palma, como una raza poco evolucionada, de buen formato, perfil ultracóncavo y plisado, longilíneos y eumétricos, con capa negra, orejas extremadamente largas y arrugas repartidas por el cuerpo.

El ganado porcino está presente en el Archipiélago Canario desde hace 2500 años, habiéndose encontrado restos en la mayoría de los yacimientos arqueológicos (Robert y cols., 2000). Los restos más antiguos proceden de los yacimientos de El Tendal y La Palmera, en la isla de La Palma, cuya ocupación fue datada mediante carbono catorce en 500 años a.C.

Si bien los orígenes de la raza aún no han sido determinados, todo hace suponer su procedencia continental muy ligada a la llegada del hombre, teniendo en cuenta el aislamiento geográfico y el origen volcánico del archipiélago. Entre las sucecivas oleadas de poblamiento humano (Pérez de Barrada, 1939; Cuscoy, 1963; Schwidetzky, 1963), fueron llegando ejemplares de poblaciones porcinas de diferentes orígenes, especialmente del Norte de África, Mediterráneo Oriental, Península Ibérica (Chato Murciano, derivado del tronco ibérico y mejorado con el Berkshire y Large White) e Islas Británicas (Berkshire y Large Blake), conformando así un grupo multirracial diferenciado de los demás y perfectamente adaptado a un medio muy singular y variado (Robert y cols., 2000).

Según García y Capote (1982), entre las razas inglesas de posible intervención tendríamos el Berkshire por su perfil, pigmentación de partes centrífugas y una cierta similitud en tamaño y posición de las orejas y el Large Blake, por su morfología y orejas. En cuanto a las razas españolas, cabría destacar al Chato Murciano, derivado del tronco ibérico y mejorado con el Berkshire y posteriormente con el Large White, por ciertas semejanzas genotípicas y su gran capacidad de asimilación de fibra. Recientemente, algunos autores han situado al CNC mediante estudios filogenéticos, dentro del grupo de razas celtas, junto con razas portuguesas como el Bísaro y el Malhado de Alcobaça, y otras razas españolas como el porco Celta y el Chato Murciano (Gama y cols., 2013).

En 1982, el mayor número de animales se concentraban en las islas de La Gomera y La Palma (García y Capote, 1982) considerándose extinta en el resto del archipiélago. En la isla de La Palma, los reproductores se concentraban en las zonas norte y noroeste (Tijarafe) y en El Paso. Según Robert y cols., (2000), en el año 2000, el censo total del CNC en el archipiélago era de 283 ejemplares (182 hembras y 101 machos) (Ilustración 1); siendo en Tenerife de 173 ejemplares reproductores, con una relación de dos hembras por macho, y un núcleo controlado por los Servicios de Agricultura del Cabildo Insular de Tenerife, (14 hembras, 2 machos y reposición de 30 lechones). El censo de reproductores incluidos en el programa de conservación del Cabildo de Gran Canaria era de 71 ejemplares, con un núcleo controlado por el Aula de la Naturaleza de la Finca de Osorio (3 hembras y 1 macho), y bastantes ejemplares dispersos sin censar. En La Gomera se estimaba un total de 10-20 parejas de reproductores. En La Palma no existía censo actualizado en el año 2000, quedando algunos ejemplares dispersos en la zona de Garafía y un núcleo de 6 reproductores controlado por los Servicios de Agricultura del Cabildo de La Palma en Puntagorda. Finalmente, en el resto de las islas se consideraba extinto, incluida la isla de Lanzarote, donde quedaban solamente 2 hembras y 1 macho en la granja del Cabildo.

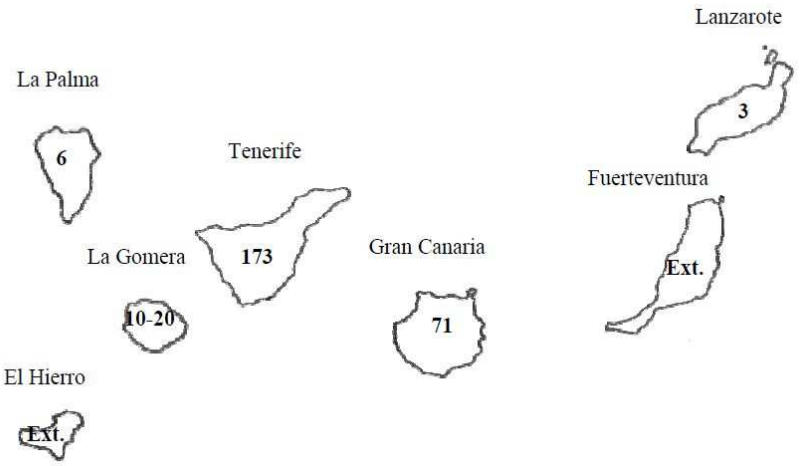


Ilustración 1: Censo total de ejemplares reproductores de CNC en el Archipiélago Canario en el año 2000. *Ext. extinto (Fuente; Servicios de Agricultura y/o Consejerías de Medio Ambiente de los Cabildos Insulares). Extraído de Robert y cols., 2000.*

En 2007, se realizó una caracterización genética de esta raza con microsatélites para conocer la situación genética de la población y los resultados obtenidos mostraron que esta población tiene una heterocigosidad y un número de alelos más bajos que otras poblaciones porcinas de la Península Ibérica, o lo que es lo mismo, una baja variabilidad genética que podría hacer peligrar este valioso recurso genético si no se toman medidas adecuadas para su conservación (Martínez y cols., 2007).

2.1.2 ESTADO ACTUAL, DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA E IMPORTANCIA

A mitad del pasado siglo, con el auge de los cruces comerciales con cerdos blancos y la aparición de los sistemas intensivos industriales, esta raza estuvo a punto de desaparecer, es por ello que actualmente se encuentra incluida en el Catálogo oficial de las Razas Ganaderas de España (Anexo I del Real Decreto 2129/2008.), dentro de las Razas Autóctonas Españolas como Raza de Protección Especial, o en grave peligro de extinción, por encontrase en grave regresión o en trance de desaparición, debido al reducido número de ejemplares reproductores existentes en aquel momento.

Gracias al esfuerzo conjunto de diferentes instituciones públicas y de algunos ganaderos agrupados en la Asociación de Criadores de Cochino Negro Canario (ACCNC) el censo ha aumentado considerablemente en los últimos 10 años. Con el objetivo de recuperar esta raza, para preservar el patrimonio genético de la misma y producir productos genuinos de alta calidad muy valorados por el consumidor, se han creado programas para la conservación y mejora genética de la raza, que obliga al incremento de los censos mediante contratos de cesión de animales puros a nuevos ganaderos que se inician en esta actividad; así como del Libro Genealógico (LG) de la raza Porcina Negra Canaria (Orden de 27 de abril de 2007, por la que se reabre el Registro Fundacional del Libro Genealógico de la Raza Porcina Negra Canaria previsto en la Orden de 13 de agosto de 2001.), se pretende seleccionar y preservar el estándar racial al minimizar la consanguinidad.

En el 2010, los ejemplares reproductores inscritos en el LG eran 418 (334 hembras y 84 machos); con mayor censo en Tenerife (183 ejemplares), seguido de Gran Canaria (135 ejemplares), La Palma (41 ejemplares) y Lanzarote (29 ejemplares), considerándose extinta en las islas de La Gomera y El Hierro (García y cols., 2011).

Según datos censales oficiales, a fecha 31 de diciembre de 2014, se encuentran inscritos en los distintos registros del LG un total de 540 ejemplares, siendo 450 hembras reproductoras y 90 machos. De estos ejemplares, 305 reproductores se encuentran inscritos en el Registro Auxiliar (260 hembras, 45 machos) y 235 en el Registro Definitivo (190 hembras y 45 machos). Estos animales se encuentran repartidos por todo el archipiélago en un total de 66 explotaciones (Fuente, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, MAGRAMA).

Los aborígenes canarios obtenían del cerdo el alimento, manteca para conservas, piel para vestimenta y huesos para la fabricación de útiles y adornos (Robert y cols., 2000). Desde siempre el CNC ha estado vinculado a explotaciones familiares como recurso para el autoconsumo. El CNC se presenta como una raza perfectamente adaptada al manejo extensivo y/o semiextensivo y cuya alimentación consiste en restos orgánicos sobrantes de la alimentación humana, restos vegetales y excedentes de la ganadería, soportando a menudo raciones de escasa palatabilidad, con altas concentraciones en fibra y deficiente valor nutritivo, abaratando de manera considerable el coste del alojamiento y alimentación, lo que supone en su conjunto un importante ahorro en los costes de producción (García y Capote, 1982).

La producción de CNC debe orientarse a un mercado diferente teniendo en cuenta su elevado valor alimentario y medioambiental, debido al aprovechamiento sostenible de subproductos agrícolas y ganaderos, lo que supone un valor añadido para la economía rural. Algunas razas autóctonas, como el Chato Murciano, tienen rendimientos de la canal superiores (80,85%) a los descritos para las razas comerciales (Peinado y col., 2004; Infocarne, 2006; Peinado y cols., 2009). En cuanto a las cualidades diferenciadas de los productos cárnicos derivados de estas razas, se ha profundizado en el estudio de algunos indicadores de calidad. En los últimos años se han volcado todos los esfuerzos de las distintas organizaciones en el desarrollo de la industria cárnica del CNC, mediante la realización de estudios de los parámetros físico-químicos de su carne, en un intento de potenciar la comercialización y la realización de un correcto diseño en la transformación y la elaboración de los productos derivados del CNC. Estudios recientes realizados sobre la composición fibrilar del músculo longísimo lumbar del CNC, procedente de explotaciones de la Isla de Gran Canaria, describen un elevado porcentaje de fibras oxidativas respecto a otras razas autóctonas porcinas españolas, lo que puede favorecer el depósito de grasa intrafibrilar, influyendo a su vez en la jugosidad y en el color de la carne (Morales J. y cols., 2011).

2.1.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y PRODUCTIVOS DEL CERDO NEGRO CANARIO

2.1.3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

- ✓ ***Aspecto general.***

La población de CNC engloba a animales que se caracterizan por su rusticidad, resistencia al medio y temperamento muy tranquilo. El estándar racial de este cerdo es propio de animales muy poco evolucionados respecto a los cerdos más primitivos. Son animales eumétricos (hembras 130kg; verracos 170kg, alzada a la cruz entre 80-85 cm) (*Fuente: Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales*), brevilíneos y con un perfil ultracóncavo (López y cols., 1992) y plisado. Tiene una piel coriácea y escamosa, con abundantes cerdas fuertes y largas distribuidas por todo el cuerpo. Es de color negro, de ahí su nombre, aunque algunos ejemplares pueden llegar a presentar manchas en la partes distales de las extremidades, frente e incluso barriga debido a los cruces con razas porcinas foráneas en la antigüedad (Ilustración 2).

- **Características regionales.**

- ✓ Cabeza: de tamaño relativamente pequeño y corta, de perfil frontonasal ultracóncavo, siendo en su conjunto voluminosa. Poseen numerosas y profundas arrugas que aumentan con la edad, tanto que en los ejemplares más puros producen oclusión de las aperturas parpebrales. Presentan orejas extraordinariamente largas y caídas en pendiente, que sobrepasan en varios centímetros la parte externa del hocico. Jeta ancha y gruesa.
- ✓ Cuello: es proporcionado y bien implantado en el tronco, con papada y sin mamellas.
- ✓ Tórax: poco pronunciado, con costillares planos y gran profundidad torácica, y de aspecto fuerte.
- ✓ Espaldas: alargada, con observable musculatura siendo más manifiesta en la parte anterior y ligera inclinación posterior.
- ✓ Dorso y lomos: presenta una línea dorsolumbar rectilínea con una inclinación creciente hasta el límite de la grupa. Son alargados y relativamente anchos.
- ✓ Grupa: tiende a ser derribada y pronunciada, denominándose "en pupitre". Su cola es recta, de nacimiento bajo, cayendo sin retorcerse en dirección perpendicular al suelo.
- ✓ Vientre y genitales externos: vientre paralelo a la línea dorsolumbar y ligeramente recogido, presentando normalmente seis pares de mamas, aunque pueden poseer más. Los machos presentan testículos con posición poco manifiesta, bien conformados, el prepucio está desarrollado. Las hembras por su parte, presentan una vulva con desarrollo normal.
- ✓ Extremidades y marcha: los jamones se caracterizan por una nalga algo escurrida, poco aparente y piernas deprimidas, presentando en general extremidades finas y cortas. En estado adulto se mueven torpe y pesadamente.
- ✓ Color y pelo: la piel, coriácea y escamosa, es oscura, sin manchas en la mayoría de los casos. Las cerdas son abundantes y fuertes, largas, distribuidas uniformemente por el cuerpo. Posee numerosas arrugas en la piel, especialmente apreciables en animales sin cebar, que forman plieges en las regiones de la cara, frontonasal, piernas y brazuelo.

Ilustración 2: Ejemplar macho adulto de CNC. Piel coriácea y escamosa, de color negro, con abundantes cerdas fuertes y largas, marcada presencia de arrugas por todo el cuerpo, orejas extremadamente largas y caídas en pendiente y grupa derribada y cola recta de nacimiento bajo y caída perpendicular al suelo sin retorcerse.

Según el Anexo III de la ORDEN de 13 de agosto de 2001, aquellos animales que no reúnan dichas características no serán inscritos en el LG, sin embargo existen ejemplares que aún presentando una serie de defectos, pueden ser incluidos en el LG, estos defectos reciben el nombre de defectos objetables, y son:

a) Defectos de aplomos no muy destacables.
b) Extremidades cortas y nalga aparente.
c) Jeta poco desarrollada.
d) Falta de arrugas características.
e) Presentación de manchas de cierta consideración en partes distales de las extremidades, frente y abdomen.

Por otro lado, y de acuerdo con la descripción del prototipo racial, se consideran como defectos descalificables los siguientes:

a) Conformación general o regional defectuosa en grado acusado, con cabeza grande y larga, perfil convexo, orejas pequeñas, cortas y levantadas en punta, perfil rectilíneo, sin plieges o arrugas, grupa horizontal y muy musculosa, capa barcina (blanco con manchas negras aisladas o de otro color diferente al incluido en el estándar), cola o rabo retorcido en estado de reposo.
b) Hernias.
c) Anomalías en los genitales: monorquidia, criptorquidia e infantilismo genital.
d) Desarrollo corporal no acorde con la edad.
e) Pigmentación total o parcial de las pezuñas.

2.1.3.2 CARACTERÍSTICAS PRODUCTIVAS

Tradicionalmente la cría era estabulada en cochiqueras llamadas “goros”, cuyo destino era el autoconsumo de las familias rurales. Actualmente, la raza está muy adaptada al manejo extensivo y/o semiextensivo, lo que facilita su enfoque ecológico. Como se comentó anteriormente, su alimentación combina recursos agrarios y subproductos ganaderos con raciones de piensos. La capacidad de pastoreo es muy buena en presencia de pastos, y con ello solamente sería necesario suplementar a final de la gestación y durante la lactación, sin embargo existen limitaciones a la hora de localizar estas zonas con autorización administrativa (García y cols., 2011)

Se realiza monta natural (relación macho/hembra de 1/10), destacando esta raza por su temprana precocidad sexual (7-8 meses), siendo recomendable la primera cubrición entre los 10-12 meses para que el animal logre una buena condición corporal.

Las explotaciones tienen una media de 2 partos por cerda y año, siendo la prolificidad media de 8-10 lechones nacidos por parto, con un peso medio al nacimiento de 1,2kg. El destete suele realizarse entre 28-42 días de edad dependiendo de la explotación (muy próximo al tiempo mínimo de 40 días exigidos en la ganadería ecológica).

La mortalidad desde el nacimiento hasta el destete está en torno al 20%, lo que establece una productividad media de 16 lechones destetados por hembra y año, llegando con un peso medio al destete de 6,5kg (hembras) - 6,7kg (machos).

Presenta un crecimiento lento pesando alrededor de 60kg de peso vivo a los 6 meses, 100kg de PV a los 9-10 meses y 130-170kg a los 12-18 meses. Si bien estos datos pueden variar dependiendo de la dieta que reciba el animal (García y Capote, 1982; López y cols., 1992). Se le presupone un elevado índice de conversión, que si bien no es equiparable al de los cerdos comerciales, se puede considerar como bueno teniendo en cuenta el tipo de alimentación que reciben (García y Capote, 1982).

La edad de sacrificio suele ser de 8-10 meses, con un peso al sacrificio recomendado para el despiece en torno a los 90-100kg, presentando un rendimiento canal del 83%. Las canales suelen ser de tipo graso, presentando un magro de excelente calidad, muy consistente y de color rojo intenso con abundante grasa infiltrada. La grasa de cobertura que se distribuye uniformemente, es fluida, blanquecina y de grano firme. La hostelería demanda principalmente cerdos de 45 kg y lechones de 7-9 kg al destete para obtener una canal de 6 kg (lechales) (López y cols., 1992; García y cols., 2011).

2.2 APARATO RESPIRATORIO DEL PORCINO

2.2.1 ESTRUCTURA NORMAL DEL APARATO RESPIRATORIO

2.2.1.1 ESTRUCTURA NORMAL DEL ÁRBOL BRONQUIAL

El aparato respiratorio se divide morfológicamente en tres sistemas independientes pero continuos, estando cada sistema constituido por estructuras histológicas particulares (López 2006):

a) Sistema de conducción
b) Sistema de transición
c) Sistema de intercambio

✓ ***Sistema de conducción: tráquea y bronquios.***

El sistema de conducción está constituido por la cavidad nasal, laringe, tráquea y bronquios (López 2006) En función del contenido de esta tesis únicamente nos centraremos en el estudio de la tráquea y bronquios.

- ***Tráquea:***

La tráquea es un tubo membranoso, flexible y cartilaginoso que forma la parte proximal del árbol traqueobronquial. En el porcino mide alrededor de 15-20 cm en animales adultos y se extiende desde la laringe, a nivel de la vértebra cervical IV-V, hasta la vértebra torácica V, donde se bifurca en bronquios principales derecho e izquierdo, dorsal a la base del corazón. La tráquea es más o menos medial en su posición excepto en su parte terminal, donde es empujada hacia la derecha por el arco aórtico. Presenta una parte cervical, que asienta en el cuello y una parte torácica, que asienta en la cavidad torácica.

La pared de la tráquea está formada por cuatro capas: mucosa, submucosa, musculocartilaginosa y adventicia (Hare, 2001a).

La mucosa da origen a numerosos pliegues longitudinales. Consta de un epitelio de revestimiento de tipo pseudoestratificado cilíndrico ciliado, constituido por células ciliadas, en cepillo; células secretoras, con predominio de células caliciformes; células exocrinas, basales y neuroendocrinas. Los cilios se dirigen cranealmente y llevan una doble capa de secreción mucosa a la que se adhieren las partículas extrañas que son vehiculadas por el aire inhalado. También se puede observar células migratorias como linfocitos, leucocitos globulares y mastocitos. Además, en la mucosa se puede ver tejido linfoide asociado (Hare, 2001a; Lopez, 2006; Dellmann y Brown., 2006).

La submucosa está constituida por tejido conectivo laxo, con una capa de fibras elásticas orientadas longitudinalmente, y células entre las que se incluyen adipocitos, fibrocitos, linfocitos, células plasmáticas, leucocitos granulares y mastocitos. Además presentan glándulas seromucosas tubuloacinares que producen la mayor parte del material que recubre la superficie ciliada de la tráquea. Algunas de ellas se encuentran también en capas más profundas de la lámina propia y entre los anillos cartilaginosos de la capa musculocartilaginosa. Estas glándulas son más numerosas en la porción proximal a nivel ventrolateral de la tráquea (Hare, 2001a y b; Dellmann y Brown., 2006).

La capa musculocartilaginosa está constituida por anillos cartilaginosos, tejido fibroelástico y músculo traqueal. En la tráquea del porcino existen de 29-36 anillos traqueales (König y Liebich 2008), arqueadas de forma que la sección transversal de la tráquea es más o menos cilíndrica. Los extremos libres de las láminas se solapan dorsalmente quedando el extremo derecho sobre el izquierdo. En la parte dorsal de la pared traqueal, los extremos libres de los anillos cartilaginosos se unen mediante el músculo traqueal, una banda de músculo liso que se fija al pericondrio de la cara interna del anillo (Hare, 2001b; Dellmann y Brown, 2006; König y Liebich, 2005).

- ***Bronquios***

El árbol bronquial está constituido por los bronquios extrapulmonares o principales que se continúan a partir de la bifurcación de la tráquea y los bronquios intrapulmonares que se bifurcan dentro del pulmón. Los bronquios principales entran en el parénquima pulmonar a nivel del hilio pulmonar (Hare, 2001a y b; Dellmann y Brown, 2006; López, 2006).

Anatómicamente, los bronquios se van ramificando repetidamente de forma pseudodicotómica (1→2) o pseudotricotómicas (1→3), reduciendo su tamaño y dando lugar a vías respiratorias de menor calibre (López, 2006).

Se clasifican de forma descendente en bronquio principal, bronquio lobar o lobular, bronquio segmental y bronquio subsegmental (Ilustración 3 A). Cada bronquio segmental junto con el segmento del pulmón que ventila constituye una unidad anatómico-funcional que se conoce con el nombre de segmento broncopulmonar. Éstos tienen típicamente forma cónica con su ápice en el bronquio y su base en la superficie externa del pulmón (Hare, 2001a y b; Dellmann y Brown, 2006; König y Liebich, 2005; López, 2006)

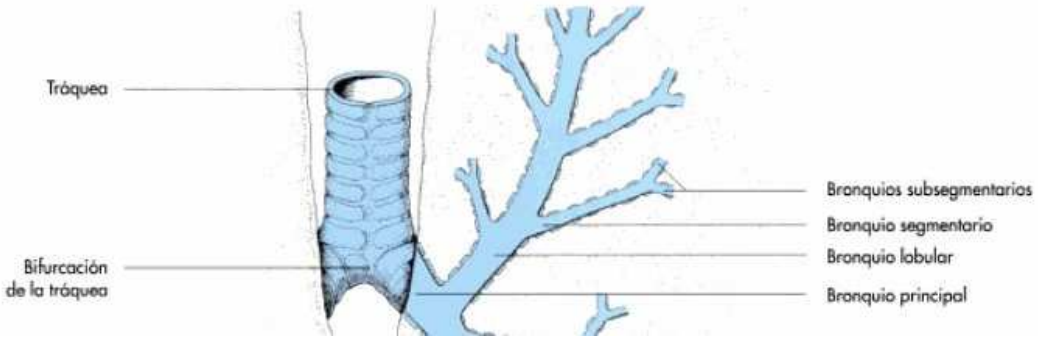


Ilustración 3 A: Representación esquemática de la estructura anatómica normal del árbol bronquial (sistema de conducción). Árbol bronquial constituido por bronquios extrapulmonares o principales y bronquios intrapulmonares, clasificados de forma descendente en bronquio lobar o lobular, bronquio segmental y bronquio subsegmental. *Modificado de König y Liebich (2005).*

En su recorrido a través de la cavidad torácica, la tráquea proporciona el bronquio lobar craneal derecho a nivel de la III costilla para luego bifurcarse en bronquios principales derecho e izquierdo a nivel del quinto espacio intercostal (Hare, 2001b).

El bronquio lobar craneal derecho es corto y pasa lateralmente desde la tráquea para entrar en la parte craneodorsal del hilio del pulmón derecho. Inmediatamente después se divide en bronquios segmentales caudal y craneal, para ventilar al segmento broncopulmonar caudal y craneal del lóbulo respectivamente (Hare, 2001b).

El bronquio principal derecho se dirige en dirección caudolateral para entrar por la parte dorsocaudal del hilio del pulmón derecho, dando lugar al bronquio lobar medio derecho que se bifurca en bronquio dorsal y ventral para ventilar el segmento broncopulmonar dorsal y ventral del lóbulo medio derecho, respectivamente. A continuación, el bronquio principal proporciona el bronquio accesorio, el cual pasa caudomedialmente para ventilar el lóbulo accesorio. Este bronquio lobar accesorio se bifurca para ventilar los segmentos broncopulmonares dorsal y ventral del lóbulo accesorio. Finalmente, el bronquio principal derecho termina en el bronquio lobar caudal derecho, a partir del cual surgen cuatro bronquios segmentales para ventilar, por la cara ventrolateral, a los segmentos broncopulmonares ventral y lateral basal y por la cara dorsal, a los segmentos broncopulmonares caudodorsal y dorsal del lóbulo caudal derecho (Hare, 2001b).

El bronquio principal izquierdo entra en la parte dorsal del hilio del pulmón izquierdo. Inmediatamente después se divide dando lugar al bronquio craneal izquierdo para ventilar el lóbulo con el mismo nombre. Este bronquio es corto y se divide en bronquios segmentales para ventilar a los segmentos broncopulmonares craneal y caudal del lóbulo craneal izquierdo. Finalmente este bronquio principal ventila al lóbulo caudal izquierdo mediante el bronquio lobar del mismo nombre, cuya disposición segmental broncopulmonar es similar a las descritas para el pulmón derecho (Hare, 2001b).

La estructura de la pared bronquial varía con el tamaño de los bronquios. Se pueden reconocer tres tipos de bronquios, grandes, medianos y pequeños; si bien, no existe una demarcación clara entre ellos. Por lo general, los bronquios principales derecho e izquierdo y la primera parte del bronquio lobar caudal son clasificados como grandes bronquios. Los bronquios lobares, craneal, medio y accesorio y los bronquios segmentales se clasifican como medianos y los restantes, como pequeños bronquios (Hare, 2001a).

La histología de los bronquios es similar a la de la tráquea, siendo las distintas capas más delgadas. Así se distinguen cuatro capas: mucosa, submucosa, musculocartilaginosa y adventicia (Dellmann y Brown, 2006).

La mucosa está provista de un epitelio respiratorio, una capa basal membranosa y la lámina propia. El epitelio es de tipo pseudoestratificado cilíndrico ciliado y además presenta células productoras de moco o células caliciformes y células basales (Dellmann y Brown, 2006; López, 2006) (Ilustración 3 B). Los bronquios grandes presentan tres o cuatro filas de células ciliadas, número que se reduce gradualmente con cada bifurcación, para en los bronquiolos quedar representado por una capa simple de células cilíndricas o cúbicas (Hare, 2001a y b). Las células basales tienen como función el anclaje y proliferación de las células ciliares. Además existen células en cepillo *(brush cells)* cuya función no es bien conocida y células neuroendocrinas (APUD) que están implicadas en el metabolismo de la serotonina, epinefrina, norepinefrina, dopamina y neurotensina. La mucosa bronquial también posee una población importante de células migratorias como son linfocitos, leucocitos globulares, de función desconocida y células cebadas de la lámina propia. Todas estas células participan conjuntamente en la inmunidad local y en el proceso inflamatorio, así como también en reacciones de tipo alérgico (López, 2006). La lámina propia de la mucosa está formada por fibras reticulares, elásticas y de colágeno. Inmediatamente después de la membrana basal hay una red de capilares muy destacada. Las glándulas seromucosas localizadas en la lámina propia de la mucosa son otras estructuras de importancia en la fisiología e histopatología bronquial. El número y tamaño de estas glándulas es mucho menor en los bronquios que en la tráquea. La mucosa de los bronquios está casi siempre exenta de pliegues longitudinales, pero a medida que el calibre disminuye, los pliegues son más acentuados.

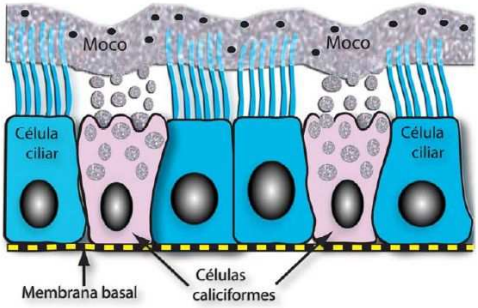


Ilustración 3 B: Representación esquemática de la estructura histológica de la mucosa bronquial. Epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado y células productoras de moco o células caliciformes. *Modificado de López (2006).*

La submucosa es una capa laminar de tejido conectivo laxo que permite a la mucosa deslizarse sobre la capa musculocartilaginosa. La submucosa está bien desarrollada en los grandes bronquios y se hace más delgada en la parte distal. En los grandes bronquios, la submucosa es más fuerte, está en contacto con las placas cartilaginosas y presenta glándulas bronquiales que disminuyen en número en los bronquios distales (Hare, 2001a y b; Dellmann y Brown, 2006).

La capa musculocartilaginosa es externa a la submucosa. En los grandes bronquios se encuentra constituida por anillos cartilaginosos, con músculo liso cuyas fibras se disponen de forma circular. Proximodistalmente la cantidad de cartílago disminuye mientras que la de músculo liso se hace relativamente mayor. Entre la capa muscular y la que contiene los anillos y el tejido fibroelástico hay tejido conectivo que contiene glándulas mucoserosas, tubuloalveolares, bronquiales, tejido adiposo y numerosos vasos y nervios. Las glándulas bronquiales se extienden desde la tráquea hasta los pequeños bronquios. Son especialmente numerosas en los bronquios de tamaño medio y el conducto secretor pasa a través de la mucosa y se abre en la luz del tubo. Los bronquios de pequeño tamaño marcan el final del sistema de conducción del árbol bronquial y las divisiones sucesivas de éstos acaban en bronquiolos (Hare 2001a y b; Dellmann y Brown 2006).

- ✓ ***Sistema de transición: Bronquiolos***

Los bronquiolos constituyen el sistema de transición. Son estructuras tubulares microscópicas que surgen de los bronquios y conectan el sistema de conducción con el sistema de intercambio gaseoso. Generalmente hay tres o cuatro divisiones bronquiolares. La parte terminal del árbol bronquial está formada por los bronquiolos terminales que, en el cerdo, llevan directamente a los conductos alveolares (Ilustración 4 A) (Hare, 2001a y b; Dellmann y Brown., 2006).

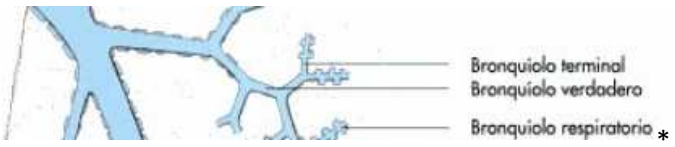


Ilustración 4 A: Respresentación esquemática de la estructura anatómica normal del árbol bronquial (sistema de transición). Existen tres o cuatro divisiones bronquiolares hasta llegar a los bronquiolos terminales. En el cerdo los bronquiolos terminales llegan directamente a los conductos alveolares estando ausentes, en el porcino, los bronquiolo respiratorio (*). *Modificado de König y Liebich (2005).*

La mucosa bronquiolar está compuesta por un epitelio mixto de células ciliares y células exocrinas bronquiolares o células de Clara, y carecen de células caliciformes productoras de moco (Ilustración 4 B). En el sistema de transición los cilios van desapareciendo de forma gradual. Las porciones proximales de los bronquiolos están recubiertas de un epitelio columnar o cúbico con pocas células ciliares mientras que las regiones más distales están formadas por epitelio cúbico desprovisto de cilios conocido como epitelio no ciliar. Las células no ciliares producen secreciones importantes como proteínas, carbohidratos y lípidos. Un tipo importante de células secretoras no ciliar son las células de Clara, que se observan sobre todo a nivel de los bronquiolos terminales y se caracterizan por ser células cuboidales con abundante retículo endoplasmático rugoso, gránulos de secreción y numerosas mitocondrias. Numerosos estudios han revelado que juegan un papel importante en la eliminación de toxinas pulmonares, regulación del sistema inmune y reparación epitelial (Reynolds and Malkinson, 2010).

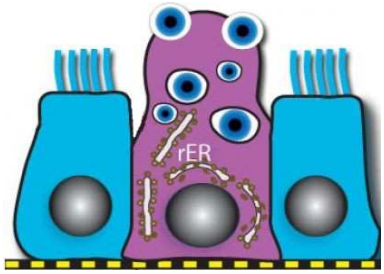


Ilustración 4 B: Representación esquemática de la estructura histológica de la mucosa bronquiolar. Epitelio mixto de células ciliares (azul) y células exocrinas bronquiolares o células de Clara (lila) con abundante retículo endoplasmático rugoso (rER), gránulos de secreción y numerosas mitocondrias. *Modificado de López (2006).*

Una diferencia notable entre bronquios y bronquiolos es que estos últimos no poseen cartílago ni glándulas en la submucosa. El tejido conectivo laxo es escaso y las capas musculares son relativamente gruesas con las fibras musculares dispuestas en espiral. Además existen numerosas fibras nerviosas dispuestas entre las fibras musculares justo por debajo del epitelio (Hare 2001a y b; Dellmann y Brown, 2006; López, 2006).

- ✓ ***Sistema de intercambio: bronquiolos terminales y alveolos***

El área de intercambio gaseoso o parénquima comprende una unidad estructural y funcional:

La unidad funcional donde tiene lugar el intercambio gaseoso se denomina acino. Un acino se compone de todos los espacios aéreos distales a un único bronquiolo terminal. Cada bronquiolo terminal se divide en dos bronquiolos respiratorios que pueden dividirse dos veces más, llegando a existir entonces bronquiolos respiratorios hasta de tercer orden. Cada uno de estos bronquiolos proporciona un número variable de conductos alveolares los cuales se ramifican inmediatamente y desembocan en los sacos alveolares y alveolos. En el cerdo, los bronquiolos respiratorios a menudo están ausentes y los conductos alveolares surgen a partir de las divisiones de los bronquiolos terminales (Hare, 2001a y b; López, 2006).

La unidad estructural viene definida por el lobulillo pulmonar, y comprenden un grupo de tres a cinco bronquiolos terminales, cada uno de ellos con sus acinos alveolares correspondientes, que se separan de los grupos adyacentes mediante un septo de tejido conectivo. Los septos interlobulillares están formados por colágeno, fibras elásticas y vasos sanguíneos (arteria bronquial y venas pulmonares). En el cerdo, la estructura lobulillar es muy marcada (Dungworth, 1993; Fawcett, 1995; Dellmann y Brown, 2006; López, 2006).

Los alveolos son pequeños espacios de aire con unas paredes muy finas. La pared de un alveolo consta de una red de capilares, que se anastomosan libremente soportados por numerosas fibras elásticas, recubierta por una delgada capa (0,2 µm) de epitelio alveolar continuo. Las capas de epitelio alveolar y endotelio capilar se sostienen mediante una membrana basal. La difusión del oxígeno y dióxido de carbono se realiza a través del epitelio alveolar, la membrana basal y el endotelio capilar. En su conjunto esta estructura recibe el nombre de barrera hematogaseosa (Weibel, 1973; Hare, 2001a).

El revestimiento epitelial alveolar, adyacente al espacio aéreo está constituido por una capa celular continua muy fina (Ilustración 5), formada por dos tipos de células:

- ***Neumocitos tipo I o membranosos***, son considerablemente delgados o aplanados. Se disponen formando una lámina que recubre el 90-95% de la superficie alveolar. Esta fina lámina es ideal para el intercambio gaseoso pero muy vulnerable a las agresiones externas (López, 2006).
- ***Neumocitos tipo II o granulares***, éstos tienen forma cúbica o redondeada, representan el 5-10% restante del epitelio alveolar y su principal función es la de sintetizar y secretar el surfactante pulmonar. Además son las principales células que intervienen en la regeneración del epitelio alveolar (Zhao y cols., 2010). El surfactante pulmonar está compuesto por fosfolípidos y proteínas (10%). Dos de estas proteínas (SP-A y SP-D) son hidrofílicas y modulan la respuesta inmune innata y adaptativa del pulmón (Pastva y cols., 2007), mientras que otras dos proteínas hidrófobas (SP-B y SP-C) presentan propiedades tensioactivas (Nogee, 2004), manteniendo en equilibrio el líquido en las vías aéreas y facilitando el aclaramiento bronquial (Hohlfeld y cols., 1997).

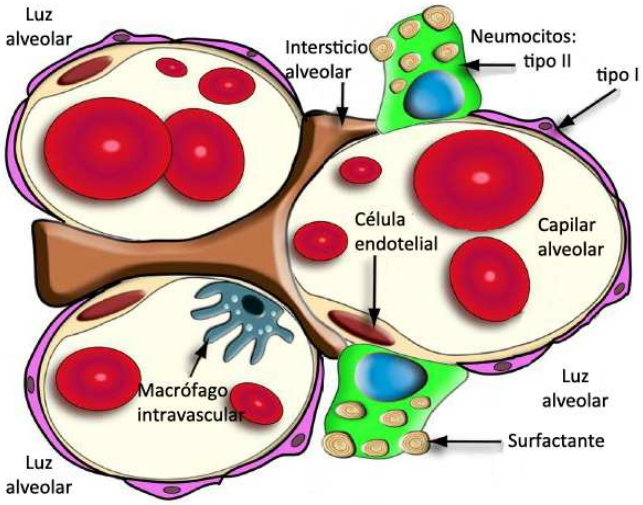


Ilustración 5: Representación esquemática del sistema de de intercambio gaseoso. Nótese la delgada membrana que separa el compartimento sanguíneo, constituido por una red de capilares, de la luz alveolar. Los neumocitos tipo I son células aplanadas que se disponen formando una lámina que recubre la superficie alveolar (90-95%). Los neumocitos tipo II, con forma cúbica o redondeada, también recubren la superficie alveolar (5-10%) y sintetizan y secretan el surfactante pulmonar. *Modificado de López (2006).*

2.2.1.2 ESTRUCTURA NORMAL DEL PULMÓN

El pulmón es un órgano par, derecho e izquierdo. Ocupa la mayor parte del espacio de la cavidad torácica y está cubierto por una pleura pulmonar e invaginado en el saco pleural ipsolateral (Hare, 2001a).

El pulmón derecho está subdividido por fisuras interlobulares en cuatro lóbulos: craneal, medio, caudal y accesorio. Es ligeramente mayor que el pulmón izquierdo, el cual solo tiene dos lóbulos, de acuerdo con los segmentos broncopulmonares: lóbulo craneal, con su porción craneal y caudal divididas por la escotadura cardiaca y lóbulo caudal (Ilustración 6) (Nakakuki, 1994; Hare, 2001b; Roger y cols., 2008; Dyce y cols., 2010)

Cada pulmón presenta un vértice craneal, que ocupa el espacio formado por la *cupula pleurae*, siendo el vértice del pulmón derecho mayor que el del pulmón izquierdo; una base caudal, relacionada con la superficie torácica convexa del diafragma; dos superficies (costal y media) y tres bordes (dorsal, ventral y basal). Cada lóbulo a su vez se divide en lobulillos mediante septos interlobulillares (Hare, 2001a y b).

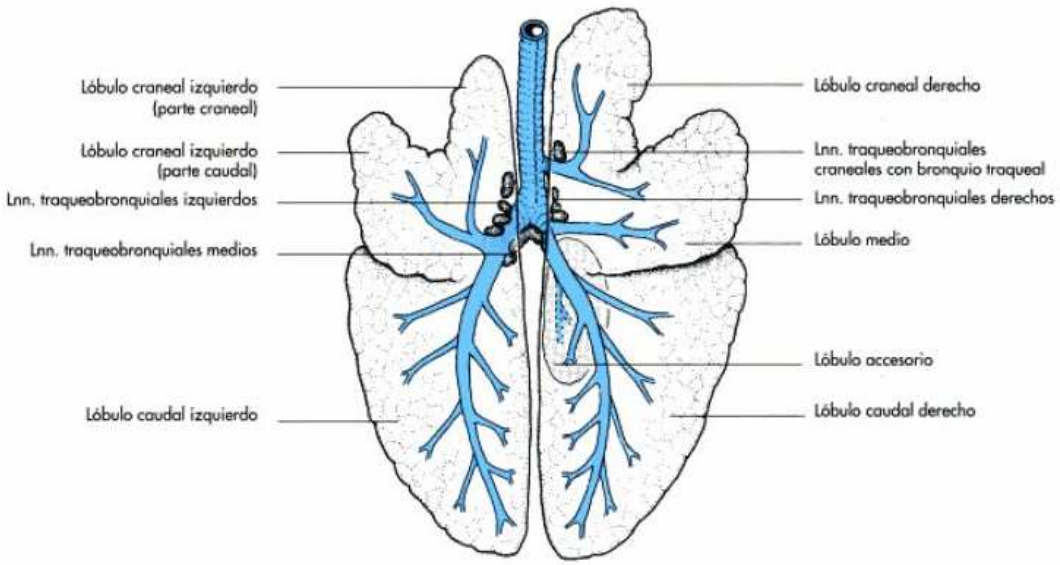


Ilustración 6: Representación esquemática de la segmentación de los lóbulos pulmonares y linfonodos (Lnn) del cerdo. Vista dorsal. *Extraido de König y Liebich (2005).*

- ✓ ***Vascularización:***

Acompañando a las ramificaciones bronquiales existe una doble circulación arterial (funcional y nutricia).

Las ramas del tronco pulmonar, las arterias pulmonares conducen sangre venosa a los pulmones y se ramifican junto con las subdivisiones del árbol bronquial hasta llegar a los alveolos. Allí terminan en capilares que rodean a los alveolos en forma de pequeños canastos. Hay aproximadamente 10 asas capilares en cada alveolo. Las asas capilares cortas (capilares de reposo) están permanentemente vascularizadas, mientras que las asas capilares largas (capilares de trabajo) se encargan de proporcionar una perfusión más intensa en caso de que existan unas necesidades mayores de oxígeno. La mayor parte de sangre procedente de los pulmones y la de la pleura pulmonar retornan a la aurícula izquierda del corazón por medio de las venas pulmonares. Los lóbulos drenan exclusivamente a través de las venas lobulares, que están muy relacionadas con los bronquios lobares correspondientes (König y Liebich, 2005).

La rama bronquial impar (arteria que surge de la cara ventral de la aorta) junto con la arteria esofágica craneal, forman la arteria broncoesofágica. La rama bronquial pasa ventralmente sobre la superficie derecha del esófago para alcanzar la cara dorsal de la bifurcación traqueal. A este nivel se divide en ramas bronquiales derecha e izquierda; una rama bronquial va al lóbulo craneal derecho y las últimas ramas van a la tráquea. Dentro del pulmón, las ramas bronquiales se sitúan alrededor de los bronquios y proporcionan ramas a la pared bronquial y *vasa vasorum* de los vasos pulmonares. Las ramas bronquiales también proporcionan ramas que van al septo interlobular e irrigan la pleura pulmonar. Las ramas bronquiales terminan en los extremos distales de los bronquiolos terminales junto al lecho capilar (McLaughlin y cols., 1961; Hare, 2001a).

- ✓ ***Linfonodos:***

Los linfonodos del pulmón o linfonodos traqueobronquiales están situados en la bifurcación de la tráquea. En el cerdo se describen los linfonodos traqueobronquiales craneales, derechos, izquierdos y medios (Ilustración 6) (König y Liebich, 2005).

Existen dos juegos de vasos linfáticos que drenan los pulmones: los superficiales y los profundos. Los capilares linfáticos del drenaje superficial se originan en el tejido conjuntivo pleural y drenan hacia el hilio en el tabique interlobulillar. Los vasos profundos se originan a nivel de los bronquiolos terminales y siguen el patrón del árbol bronquial hacia el hilio del pulmón. Los vasos profundos se anastomosan con el drenaje superficial en los tabiques interlobulillares. No se han demostrado la existencia de vasos linfáticos interalveolares (Fawcett, 1995).

- ✓ ***Inervación:***

La inervación pulmonar es vegetativa. Las fibras simpáticas del ganglio cervical medio y caudal irradian hacia el mediastino y a nivel de la base del corazón se unen con ramas parasimpáticas del nervio vago para formar el plexo cardiaco, desde el que parten fibras hacia el pulmón, para formar allí el plexo pulmonar. El pulmón es pobre en fibras simpáticas, la inervación vegetativa tiene a su cargo las glándulas bronquiales, los músculos de los bronquios y los vasos sanguíneos. Las fibras aferentes provienen de la mucosa bronquial y de receptores de estiramiento (König y Liebich, 2005).

2.2.1.3 PLEURA

Es una fina capa de tejido conjuntivo con escasos fibroblastos, fibras de colágeno y varias capas de fibras elásticas. En su superficie interna está cubierta por una capa de células mesoteliales similar a la que reviste la cavidad peritoneal. La capa de mesotelio situada sobre la pared torácica es la pleura parietal y la que se dispone sobre la superficie pulmonar es la pleura visceral. Una característica especial de la pleura es el gran número de capilares y vasos linfáticos que contiene. En los porcinos, la pleura visceral se extiende en profundidad continuándose con el tejido conjuntivo interlobulillar que separa completamente los lobulillos pulmonares (Dellmann y Brown, 2006; Dungworth, 1993; Fawcett, 1995).

2.2.2 FUNCIÓN DEL APARATO RESPIRATORIO

El aparato respiratorio está constituido por un conjunto de órganos cuya función es la de mediar en el intercambio gaseoso, permitiendo el paso del oxígeno inhalado a la sangre y del dióxido de carbono de la sangre al aire, regulando a su vez la temperatura corporal. La presencia de receptores sensoriales y una mucosa húmeda y cálida a nivel de las vías respiratorias altas permiten la filtración, humidificación y calentamiento del aire inhalado (Krejci, 2013). El intercambio gaseoso entre el aire inhalado y la sangre venosa presente en la arteria pulmonar tiene lugar a nivel alveolar. Con cada inspiración se renueva solo una pequeña parte del volumen total de aire alveolar. En un cerdo en reposo, se renueva el 10-15% del aire alveolar por inspiración. La frecuencia respiratoria normal (respiración/minuto) depende de la edad del animal así, lechones y animales en crecimiento presentan entre 25-40, los animales al final del cebo entre 25-35 y las cerdas en lactación entre 15-20 respiraciones por minuto (Sorensen y cols., 2006).

2.2.3 MECANISMOS DE DEFENSA DEL APARATO RESPIRATORIO

La superficie de la mucosa del tracto respiratorio proporciona una delgada barrera entre el animal y su entorno. Mientras que la piel está muy bien adaptada para prevenir la invasión de potenciales agentes nocivos, la superficie epitelial del tracto respiratorio sirve principalmente como una membrana de difusión.

Para el intercambio gaseoso se necesita una superficie extensa, así que el aparato respiratorio dispone de un sistema de defensa potente y especializado.

El sistema inmune de las vías respiratorias se puede dividir en dos partes morfológica y funcionalmente bien diferenciadas pero que actúan de forma coordinada como sigue: la inmunidad regulada por el sistema inmune propio de la mucosa y la inmunidad del parénquima pulmonar regulada por el sistema inmune local (Bienenstock y Clancy, 1994; Pabst, 1996; Brandtzaeg y cols., 1999).

De esta manera, tenemos los mecanismos de defensa del tracto respiratorio y del parénquima pulmonar propiamente dicho, existiendo en ambos casos mecanismos de defensa de carácter inespecífico o no inmunológico y los mecanismos de defensa específicos o inmunológicos.

2.2.3.1 MECANISMOS DE DEFENSA DEL TRACTO RESPIRATORIO

- ✓ ***Mecanismos de defensa inespecíficos***

Estos mecanismos de defensa juegan un importante papel en la prevención de la infección sin necesidad de activar el sistema de defensa específico, eliminando cerca del 90% de los microorganismos que llegan a las vías aéreas vehiculados por el aire inhalado. Si bien algunos de sus componentes actúan como nexos de unión entre el sistema de defensa específico y el inespecífico (Krejci, 2013).

Un componente muy importante del sistema de defensa inespecífico es la mucosa del tracto respiratorio y sus secreciones. La mucosa está limitada por el epitelio respiratorio y no sólo actúa como barrera mecánica sino que además presenta una actividad cinética y secretora muy importante (Krejci, 2013).

- ***Aparato mucociliar y epitelio ciliado.***

Está constituido por la mucosa y el moco que ésta produce. Es uno de los sistemas más importantes en la protección de las vías respiratorias. Su principal función es la de eliminar continuamente de la mucosa las partículas extrañas (polvo o microorganismos) que llegan a las vías aéreas en el aire inhalado. Debido a su extensión, el aparato mucociliar es una barrera casi insuperable por las partículas en condiciones fisiológicas (Krejci, 2013). El aclaramiento de la mucosa respiratoria resulta de la interacción entre el epitelio ciliar y la capa superior del moco secretado por la mucosa (Krejci, 2013).

El epitelio ciliar recubre la mayor parte de la superficie mucosa de las vías respiratorias, desde la porción proximal de la cavidad nasal hasta los bronquiolos terminales donde se transforma en un epitelio columnar no ciliado (Baskerville, 1970). El epitelio ciliar está constituido por células columnares ciliadas. Se estima que cada célula ciliar posee alrededor de 200-300 cilios con una longitud de 6 µm aproximadamente que realizan unas 300-600 movimientos por minuto (Breeze, 1976; Reynolds, 1991; Chilvers y O'Callaghan, 2000). Los movimientos rítmicos de los cilios dan lugar a un flujo de aproximadamente 100-300 µm x s^{-1} (Nicod, 1999). Este movimiento se realiza en dos fases: una rápida que moviliza la capa "gel" y otra 3 veces más lenta o fase de reposo (Sleigh, 1977).

El moco es uno de los componentes más importantes del aparato mucociliar. Su secreción es llevada a cabo por las células secretoras a lo largo de todo el tracto respiratorio. Sin embargo, su composición varía a lo largo del mismo, siendo moco propiamente dicho en los tramos más proximales y más seroso a medida que avanza hacia los bronquiolos terminales y alveolos (Cone, 1999). Además de actuar como barrera mecánica sobre la superficie del aparato respiratorio, el moco presenta una elevada cantidad de sustancias antimicrobianas no específicas (Ganz, 1999; Travis y cols., 1999; Zhang y cols., 2000; Schutte y McCray, 2002). El moco de las vías aéreas se estructura en dos capas que difieren en composición y viscosidad. Una capa más externa o capa "gel" con propiedades físicas viscoelásticas, cuya matriz está constituida por moléculas de glicoproteínas mucina (1-3%), que se desplaza sobre la capa mas interna transportando las partículas o patógenos adheridos. Su espesor varía entre los 2-20 µm. La capa más interna o "periciliar" es más serosa y mide entre 5-10 µm de espesor y permite el libre movimiento de los cilios (Cone, 1999; Chilvers y O'Callaghan, 2000; Krejci, 2013).

El moco respiratorio protege, hidrata y humidifica las vías aéreas y está constituido por sales (1%), proteínas y glicoproteínas (mucinas) (2-4%) y agua (95%). Actúa como barrera de difusión y filtración del líquido de las vías respiratorias y está íntimamente involucrado en la defensa mucociliar local (Chilvers y O'Callaghan, 2000).

Aproximadamente el 90% de las partículas inhaladas con un diámetro superior a 2-3 µm se depositan en el moco que recubre el epitelio ciliado. Estas partículas, junto con el moco, son transportadas desde los bronquiolos terminales hasta la tráquea mediante el movimiento de los cilios (Nicod, 1999).

Casi todas las partículas de más de 10 µm quedan atrapadas en la cavidad nasal debido a la fuerza centrífuga generada por los cornetes nasales en el flujo del aire. Estas partículas impactan en la mucosa y quedan atrapadas en el moco. Solo las partículas menores de 10 µm logran pasar a través de la cavidad nasal y llegar a la tráquea y los bronquios (Sorensen y cols., 2006).

Aquellas partículas más pequeñas (2-10 µm) quedan atrapadas en las bifurcaciones bronquiales donde tiene lugar un cambio brusco en el flujo del aire provocando que las partículas suspendidas choquen contra las paredes y queden atrapadas en el moco. Estratégicamente localizadas a este nivel, se encuentran agregados de tejido linfoide asociado a los bronquios (*bronchus-associated lymphoid tissue*, BALT) (López, 2006; 2009).

Solo las partículas de diámetro inferior a 2 µm logran atravesar el sistema de transición y llegar al sistema de intercambio. Los alveolos carecen de cilios y por tanto a este nivel no se produce atrapamiento mucociliar. El mecanismo de defensa principal a este nivel son los macrófagos pulmonares alveolares, como se comentará más adelante (López, 2006; 2009).

El moco contiene numerosas sustancias que presentan una importante actividad antimicrobiana. Entre los elementos que contribuyen a la defensa pulmonar y que se encuentran en el moco están las inmunoglobilinas (Ig) de tipo IgA secretadas, lisozimas, lactoferrinas, defensinas y el interferón (Nicod, 1999; Zhang y cols., 2000).

- ***IgA:*** secretadas por las células epiteliales son la primera línea de defensa de la inmunidad adaptativa. Son particularmente importantes, ya que neutralizan toxinas, virus y bloquean la entrada de bacterias a través del epitelio. Por otro lado, son pobres activadores de la vía clásica del complemento, pero pueden activar la vía alternativa que permite una mejor opsonización de las bacterias (Underdown y Schiff, 1986).
- ***Lisozima:*** es una enzima producida por la mayoría de las células fagocíticas y en menor medida por las células epiteliales. Están involucradas en la digestión de las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas. Y se trata de la enzima bactericida más comúnmente secretada de forma natural en el tracto respiratorio de la mayoría de los mamíferos (Travis y cols., 1999).
- ***Lactoferrina:*** es una proteína que se encuentra en los gránulos específicos de los neutrófilos y tanto estructural como funcionalmente guarda una estrecha relación con la transferrina sérica. Es liberada por los neutrófilos y las células epiteliales secretoras a las vías aéreas y ejerce su acción gracias a la presencia del ión férrico necesario para el crecimiento de la mayorías de las bacterias patógenas (Euzeby, 1993; Pruitt, 1999; Adlerova, 2008) .
- ***Defensinas:*** son relativamente abundantes en las vías aéreas. Al contrario que en el tracto digestivo donde predomina la defensina α, en el tracto respiratorio prevelece la presencia de defensina β, presentando ambas una considerable actividad antimicrobiana de amplio espectro (Zhang y cols., 2000), eficaz en la defensa frente a agentes bacterianos, fúngicos y víricos. Son expresadas por las células epiteliales y células mieloides, especialmente neutrófilos. Los niveles más altos de defensinas se producen en caso de infección. Su producción viene inducida por citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias, factor de crecimiento y productos microbianos (Schutte y McCray, 2002; Hiemstra, 2007). Las defensinas incrementan la permeabilidad de la membrana. Además presentan una actividad quimiotáctica atrayendo a las células dendríticas inmaduras, monocitos y linfocitos T (Ganz, 1999; Schutte y McCray, 2002).
- ***Interferón:*** participa en los mecanismos de defensa no específicos del sistema respiratorio. En caso de inflamación penetran en la mucosa del tracto respiratorio componentes de la sangre periférica y se desencadena una cascada inducida por el complemento (Euzeby, 1993). El interferón α y β son producidos principalmente por las células infectadas por virus, éstos se unen a los receptores de membrana de las células infectadas y no infectadas e inducen la síntesis de enzimas con actividad frente a la replicación viral. El interferón γ es

producido por las células Th1 con especificidad antigénica y las células NK (*Natural Killer*) y controlan varios aspectos de la respuesta inmune. Son esenciales en la supresión de infecciones intracelulares actuando como inductores de la inflamación, activadores de macrófagos, mastocitos y fibroblastos, y juegan un importante papel en la diferenciación de las células Th1 (Euzeby, 1993).

- ✓ ***Mecanismos de defensa específicos***

  - ***Componente humoral:***

El componente humoral de la respuesta inmune específica del tracto respiratorio del porcino comprende principalmente a los anticuerpos (Acs) de tipo IgA e IgG, y en menor medida a los de tipo IgM. La forma polimérica de la IgA, por lo general dímeros, y la IgM, están presentes en las secreciones de las vías aéreas. Estas Igs presentes en la mucosa del tracto respiratorio son sintetizadas localmente. La gran mayoría de las IgAs, presentes en las secreciones, son producidas por los agregados de linfocitos B dispersos por la lámina propia de la mucosa del tracto respiratorio (Bradley y cols., 1976a; Morgan y cols., 1980) y en menor medida, por los agregados organizados de tejido linfoide, incluyendo las tonsilas y el BALT (Bradley y cols., 1976b). Las IgAs producidas y liberadas por las células plasmáticas, se unen a los receptores de membrana y penetran en las células epiteliales, de aquí pasan a las células secretoras y finalmente alcanzan la luz de las vías aéreas. Cerca del 97% de los Acs de tipo IgA presentes en el tracto respiratorio de los cerdos, alcanzan la superficie mucosa por esta vía (Bradley y cols., 1976a; Morgan y cols., 1980; Mostov, 1999).

El origen de los Acs de tipo IgG en las vías aéreas del porcino no es uniforme (Krejci J, 2013). Una parte se produce localmente, sin embargo la gran mayoría atraviesan la fina barrera hematogaseosa y llegan al tracto respiratorio junto con el líquido alveolar (Bradley y cols., 1976a; Morgan y cols., 1980; Reynolds y Merrill, 1981). En caso de inflamación pulmonar esta difusión se ve incrementada considerablemente. La entrada de Acs maternales a través de la mucosa nasal y bronquial ha sido descrita en lechones. Sin embargo, los Acs presentes en la circulación sistémica no atraviesan la mucosa sana de los lechones de mayor edad ni de los cerdos adultos (Mensik, 1971a; Mensik, 1971b; Bradley y cols., 1976a; Charley y Corthier, 1977; Nechvatalova y cols., 2011).

La concentración de cada isotipo de Ig en cada una de las porciones del tracto respiratorio es distinta y depende del origen de cada uno de ellos, como ya se describió anteriormente. Así, en las secreciones de la parte proximal de las vías aéreas predominan los Acs de tipo IgA (Holmgren, 1973; Morgan y cols., 1980), mientras que la concentración de IgG es mayor en las regiones más distales (secreciones de los bronquiolos y alveolos).

A su vez, la función que cada uno de ellos desempeña depende de la proporción en la que se encuentren en la mucosa. Las IgAs son difíciles de digerir por las proteasas y por lo tanto se convierten en importantes factores de defensa que protegen la mucosa respiratoria. Protegen el sistema respiratorio de la acción de los microorganismos que penetran por las vías aéreas junto al aire inhalado sin llegar a inducir una respuesta inflamatoria ni daño en la mucosa. Estos Acs actúan evitando la adhesión de los microorganismos a la superficie de las células, y junto con otros mecanismos de defensa inespecíficos (moco, aparato mucociliar y sistema antibacteriano) facilitan la eliminación de los mismos. Las IgAs no activan la vía del complemento, sin embargo tienen una ligera capacidad de opsonización, por lo que los complejos antígenos-IgA se unen a los receptores Fc de las células efectoras y son fagocitados, neutralizando y eliminando de esta manera a los microorganismos (Krejci, 2013; Russell,

1999). Sin embargo, los Acs de tipo IgG sí activan el complemento, actúan como opsoninas y facilitan la fagocitosis de los inmunocomplejos formados a partir de la unión de estos Acs a la superficie de los microorganismos (Huang y cols., 1990; Busse, 1991; Pabst y Binns, 1994; Tizard, 2000; Krejci, 2013).

- ***Componente celular:***

El componente celular del mecanismo de defensa específico de las vías respiratorias comprende el tejido linfoide presente en la lámina propia de la mucosa y los linfonodos regionales. El tejido linfoide propio de la mucosa incluye dos partes morfológica y funcionalmente bien diferenciadas. El tejido linfoide no organizado es el más extenso, está compuesto por un elevado número de células y normalmente actúa de forma efectora. El tejido linfoide organizado es la zona inductora de la respuesta inmune. Se organiza en forma de agregados similares a los linfonodos en determinadas regiones de las vías aéreas. Al contrario que los linfonodos, estos agregados de tejido linfoide no poseen ni una envoltura ligamentosa ni vasos linfáticos aferentes (Krejci, 2013).

Tejido linfoide no organizado

Está constituido por linfocitos dispersos y pequeños agregados linfoides. En estos pequeños grupos prevalecen las células plasmáticas, los linfocitos B y linfocitos T, siendo los linfocitos T CD4+ los más abundantes en la lámina propia (Pabst, 1996). La proporción de estas células depende de la influencia antigénica o del desarrollo de algún proceso patológico en las vías respiratorias (Puci y cols., 1982). Además de los tipos celulares mencionados anteriormente, en el tejido linfoide también se observan macrófagos y en menor medida granulocitos y mastocitos. Así mismo, aparecen linfocitos intraepitelial en la mucosa del tracto respiratorio, de forma similar a lo que ocurre en el epitelio de otras mucosas (Fournier y cols., 1989; Hameleers y cols., 1989). En lechones neonatos, los linfocitos intraepiteliales no poseen antígenos (Ags) de superficie CD2, CD4 y CD8. Empiezan a expresar los Ags CD2 y CD8 en las primeras semanas de vida, de manera que ya a las 7 semanas presentan linfocitos T CD2+ y CD8+ (Whary y cols., 1995). En el epitelio bronquial, la proporción de linfocitos T CD8 es superior a la de los linfocitos T CD4 siendo la relación CD4/CD8 de 0,4 (Goto y cols., 2000). Se cree que estos linfocitos intraepiteliales participan en la inmunorregulación de la mucosa, manteniendo la integridad de la misma (Erle y Pabst, 2000).

Las células dendríticas, al igual que los linfocitos B, juegan un papel importante como células presentadoras de Ags. Se han descrito dos fenotipos distintos de estas células en el tracto respiratorio del porcino, las células dendríticas mieloides y plasmocíticas (Summerfield y McCullough, 2009). Estas células tienen una familia especializada de receptores proteicos de superficie denominada complejo mayor de histocompatibilidad (*mayor histocompatibility complex,* MHC) de clase II (MHC II), que en los cerdos se denominan Ags Leucocitarios Porcinos (*swine leucocyte antigens,* SLA). El MHC II es una proteína de transporte que fijan fragmentos de Ag y los conducen hasta la superficie celular para presentarlo a los linfocitos T cooperadores. Además el linfocito T debe estar expuesto a la acción de proteínas secretadas por macrófagos (IL-1, entre otras) para que se desencadene la respuesta inmune (Marrack y Kappler, 1986; Banchereau y Steinman, 1998).

Las células dendritas actúan de dos formas, en un animal que ha tenido contacto previo con el Ag, proporciona una superficie sobre la cual puede ser presentado el Ag junto al MHC II y en los animales con complejos Ag-Ac circulantes, las células son capaces de retener el Ag en su superficie durante más de 3 meses (Banchereau y Steinman, 1998).

Tejido linfoide organizado

El tejido linfoide asociado a la mucosa (*mucosa-associated lymphoid tissue,* MALT) está estratégicamente ubicado en distintas localizaciones a lo largo del tracto respiratorio para detectar de forma eficaz la presencia de Ags. Basado en la localización anatómica, pueden subdividirse en tejido linfoide asociado a la cavidad nasal (*nose-associated lymphoid tissue,* NALT), el tejido linfoide del anillo de Waldeyer (tonsilas) localizado en la nasofaringe, el tejido linfoide asociado a la laringe y traquea (*trachea and larynx-associated lymphoid tissue,* LTALT) y el BALT, que se localiza en las ramificaciones bronquiales (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006). Esta organización del tejido linfoide está especializada en el reconocimiento y tratamiento de Ags, y en la activación primaria de los linfocitos B. Estos agregados de tejido linfoide son similares a las placas de Peyer ubicadas en el íleon y ambos desempeñan un papel muy importante en la inducción del sistema inmune a nivel de la mucosa (Bienenstock y cols., 1999).

El BALT es un tejido linforreticular que se encuentra localizado principalmente en el interior del ángulo formado por la bifurcación de los bronquios y bronquiolos (Huang y cols., 1990). Esta zona es especialmente importante dado que en ella impactan gran cantidad de partículas. La estructura histológica del tejido linfoide facilita el atrapamiento antigénico y tiene un papel similar en la inmunidad de las mucosas. Normalmente se encuentra compuesto por un único folículo linfoide que hace protuberancia hacia el tracto respiratorio y forma un nódulo. Este folículo linfoide se extiende desde la submucosa hasta la membrana basal del epitelio respiratorio y establece contacto directo con la misma. Los folículos se encuentran compuestos principalmente por linfocitos y pocas células reticuloendoteliales. Las partículas son fagocitadas y transportadas por los macrófagos y células dendríticas especializadas, lo que facilita que los linfocitos tomen contacto con los Ags potencialmente patógenos y reaccionen dando lugar a una hiperplasia muy marcada en las enfermedades respiratorias crónicas (Pabst y Binns 1994; Sánchez-Vizcaíno, 2006). Al contrario de lo que ocurre en otras especies, en el cerdo siempre se desarrolla el BALT, y su estructura y ubicación difieren en algunos aspectos. Así por ejemplo, las zonas donde se encuentran los linfocitos B y T no están tan claramente separadas entre sí como ocurre en otras especies (Delventhal y cols., 1992a). Algunos estudios revelan una presencia de BALT en el 33% de los cerdos sanos, entre el 80-100% de los animales SPF de 4 meses y en el 100% de los cerdos híbridos de cría convencional a las 11-13 semanas de edad (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006). El 82% del BALT se localiza a nivel de los bronquiolos, un 10% en bronquiolos terminales y un 8% en los bronquios (Cho y Dee, 2006).

En caso de infección del aparato respiratorio por algunos agentes patógenos, se produce un incremento significativo de la presencia del BALT en función del área del parénquima pulmonar analizado. Algunos autores describen un incremento significativo del BALT en casos de infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, especialmente en inoculación vía oral y aerógena (Delventhal y cols., 1992b). En infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh)*,* la hiperplasia del BALT es el cambio más significativo (Livingston y cols., 1972).

Además del BALT, existen otras áreas en la submucosa del tracto respiratorio donde se observa tejido linfoide, con estructura y función similar a la del BALT. Las tonsilas son agregados de tejido linfoide localizado en las vías respiratorias altas, donde se cruza con el aparato digestivo y se diferencia en tonsila del paladar blando y tonsila lingual (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006). Mediante citometría de flujo se ha demostrado que las tonsilas presentan una cantidad importante de linfocitos B, tienen un número moderado de linfocitos αβ-T y bajo número de CD8+ y linfocitos T γδ en comparación a los linfonodos, el bazo y la sangre periférica (Yang y Parkhouse, 1996).

2.2.3.2 MECANISMOS DE DEFENSA DEL PARÉNQUIMA PULMONAR (CONDUCTOS Y SACOS ALVEOLARES)

- ✓ ***Mecanismos de defensa inespecíficos***

  - ***Componente humoral***

El líquido alveolar forma el componente humoral a nivel de los conductos y sacos alveolares. Su principal constituyente es el surfactante pulmonar, una película de fosfolípidos con una capa de polisacáridos proteicos que disminuyen la tensión en las superficies epiteliales. El surfactante no sólo facilita la respiración y previene el colapso pulmonar durante la expiración, sino que además modulan la respuesta inmune a nivel pulmonar (Pastva y cols., 2007; Haagsman y cols., 2008; Krejci, 2013). Presenta un grupo de proteínas que reciben el nombre de colectinas, éstas son la proteína surfactante *(protein-surfactant,* SP*)* A (SP-A) y la proteína D (SP-D). Como colectinas, las SP-A y SP-D se unen y opsonizan virus, bacterias, alérgenos, y células apoptóticas, potencian la fagocitosis microbiana mediante la agregación de las bacterias y los virus, poseen efectos bactericidas directos y se unen a una gran variedad de receptores de citoquinas, para modular la acción de las células inmunes y la expresión de mediadores inflamatorios. Además, actúan como mediadores entre la inmunidad innata y adaptativa regulando la respuesta del hospedador. Aunque ambas colectinas pueden unirse a las células T e inhibir su proliferación, las SP-A pueden actuar también de forma indirecta al suprimir la maduración de las células dendríticas. Por otro lado, la SP-D facilita la captación y presentación de Ags. En conjunto, se ha demostrado que la acción combinada de ambas colectinas modula la inmunidad a nivel pulmonar, protegiendo a su vez de posibles respuestas inmunes exageradas que puedan llegar a producir daño en el parénquima, dificultando así el intercambio gaseoso (Pastva y cols., 2007).

  - ***Componente celular***

El componente celular de los mecanismos de defensa inespecífico está representada por una amplia red de macrófagos y células dendríticas. Éstos se clasifican en macrófagos alveolares pulmonares (*pulmonary alveolar macrophages,* PAMs), intersticiales y macrófagos alveolares intravasculares (*pulmonary intravascular macrophages*, PIMs).

Macrófagos alveolares:

Los macrófagos son células derivadas de la médula ósea que han migrado a la sangre, diferenciándose en monocitos sanguíneos, para posteriormente llegar hasta los distintos tejidos y convertirse en macrófagos. Así, los monocitos alcanzan el intersticio de los pulmones y se transforman en macrófagos que migran a la luz de los alveolos donde reciben el nombre de PAMs y son los encargados de neutralizar todas aquellas partículas extrañas que escapan del mecanismo de defensa mucociliar (Nicod, 1999; Sorensen y cols., 2006). Son células grandes, de alrededor de 15 µm de diámetro, que presentan gran cantidad de lisosomas muy ricos en enzimas hidrolíticas (lisozimas) y cuya función es, entre otras, actuar sobre los peptidoglicanos de la pared bacteriana. Mediante inmunohistoquímica (IHQ) es posible marcar esta enzima para determinar la presencia de macrófagos y neutrófilos (Álvarez y cols., 1997; Sánchez-Vizcaíno, 2006; Tizard, 2000).

Se localizan sobre la superficie alveolar, quedando en contacto directo con las partículas de polvo y las bacterias inhaladas que han escapado al atrapamiento mucociliar en las porciones proximales de las vías respiratorias. Son continuamente eliminados y sustituidos. Muchos de ellos migran desde los alveolos hasta la superficie de los bronquios, y son transportados por el aparato mucociliar a través del sistema respiratorio superior hasta la faringe, en donde son deglutidos con la

saliva. Además se sabe que otros viajan nuevamente a través del parénquima y los vasos linfáticos hasta alcanzar los linfonodos bronquiales (Sibille y Reynolds, 1990; Nicod, 1999).

Los PAMs tienen múltiples funciones que llevan a cabo a través de la liberación de mediadores químicos. Las partículas y microbios no patógenos son atrapados por fagocitosis y se eliminan en el flujo de moco o a través del sistema linfático. Los microorganismos patógenos son neutralizados con ayuda de lisozima, interferones, opsoninas, lactoferrinas, factores del complemento e inmunoglobulinas específicas presentes en el moco. Si el agente invasor no es neutralizado por los PAMs, se produce la inflamación. Los neutrófilos circulantes en la sangre acuden a los alveolos y ayudan a los macrófagos en la fagocitosis (López, 2009).

En cerdos sanos, 85-90% de los elementos celulares presentes en el moco broncoalveolar son PAMs. Además encontramos linfocitos (5-8%) y neutrófilos (4-7%) (Jolie y cols., 2000; Krejci J, 2013). Estas células se pueden recolectar fácilmente mediante lavado broncoalveolar y las alteraciones en los valores absolutos, relativos y en la citomorfología son de gran valor diagnóstico en enfermedades respiratorias. Algunos agentes infecciosos, como Mh o el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino *(porcine reproductive and respiratory syndrome virus,* PRRSv*)*, tienen a los PAMs como células diana. En la infección por Mh*,* suprime la función de los PAMs y producen un incremento en la concentración de los mediadores químicos de la inflamación en el líquido del lavado broncoalveolar, mientras que PRRSv se replica en estas células (Asai y cols., 1996; Mengeling y cols., 1996b; Pabst, 1996; Pijoan, 1996).

El sistema de fagocitosis celular también compromete a los PIMs, que en el cerdo son particularmente numerosos a nivel pulmonar (Bertram, 1985; Ohgami y cols., 1989) y a los histiocitos con propiedades fagocíticas presentes en el tejido conectivo.

La actividad de los fagocitos se ve altamente acelerada si los patógenos introducidos no son eliminados rápidamente o si se reconocen patógenos de infecciones anteriores. Se produce una respuesta inmune mediada por células, seguida por una producción local y sistémica de Acs o inmunoglobulinas específicas.

- ✓ ***Mecanismos de defensa específicos***

  - ***Componente humoral***

Está representado por los Acs presentes en el líquido alveolar y en los vasos pulmonares. Estos Acs son principalmente inmunoglobulinas del tipo IgG. La mayor parte de estos Acs se producen localmente en el tejido pulmonar sano, y solo una pequeña proporción penetran de forma pasiva a través de la barrera hematogaseosa (Charley y Corthier, 1977; Morgan y cols., 1980). Esta proporción se incrementa de forma significativa cuando tiene lugar una inflamación pulmonar (Krejci y cols., 2005). La inducción de una respuesta inmune rápida, limitada en el tiempo y en el espacio, y lo suficientemente intensa es el mecanismo de defensa más deseable. Además de las IgG, en el parénquima pulmonar también se presentan Acs de tipo IgA, aunque en menor medida, según Bradley y cols. en 1976, quienes encontraron agregados de células plasmáticas productoras de IgAs relativamente numerosas en el intersticio pulmonar (Bradley y cols., 1976a).

- ***Componente celular***

El componente celular de los mecanismos de defensa específicos a nivel alveolar está representado principalmente por linfocitos T (Krejci, 2013).

Provienen de la médula ósea a partir de sus precursores hematopoyéticos, maduran en el timo y luego migran hasta el paracortex de los nódulos linfoides, la vaina linfoide periarteriolar del bazo, áreas interfoliculares de las placas de Peyer y áreas parafoliculares del tejido linfoide asociado al intestino y BALT, lugares donde se acumulan. Son los linfocitos predominantes (80% en sangre periférica) y son los responsables de los mecanismos de inmunidad celular.

A nivel pulmonar estos linfocitos se pueden clasificar según su localización en: linfocitos intersticiales, intra-alveolares e intravasculares (Pabst, 1996).

Además existe una población de linfocitos que no son T ni B de gran importancia en la respuesta inmune natural o innata, son las células NK. Probablemente comparten el origen celular con los linfocitos T pero no sufren el procesamiento tímico, se encuentran en todos los tejidos y son escasos en sangre (Tizard, 2000).

En lavados broncoalveolares el recuento de linfocitos T a nivel alveolar es mayor que el de linfocitos B (80% *vs* 5%) y de células NK (10-15%). A su vez, dentro de los linfocitos T, la proporción de linfocitos T CD4+ es mayor que la de CD8+ (50% *vs* 30%) (Nicod, 1999)

2.2.4 RESPUESTA A LA INJURIA EN EL APARATO RESPIRATORIO

2.2.4.1 INJURIA Y RESPUESTA BRONQUIAL

Como se comentó anteriormente, la mucosa bronquial está expuesta a una gran variedad de agentes químicos y biológicos. La superficie del epitelio bronquial está protegida por una fina capa de moco producido por las células caliciformes y las glándulas bronquiales. Este moco absorbe y neutraliza muchos de los agentes químicos comúnmente inhalados y también actúan como barrera física atrapando e impidiendo adherencia de agentes infecciosos como bacterias, micoplasmas o agentes víricos. Tanto las partículas como los gases atrapados en el moco son expulsados rápidamente al exterior mediante el constante movimiento de los cilios.

Cuando tiene lugar un daño agudo del epitelio bronquial, el resultado puede ser degeneración, desprendimiento y exfoliación de las células ciliadas hacia la luz bronquial (López, 2006).

En condiciones normales, la reparación de la mucosa bronquial en respuesta al daño agudo se lleva a cabo en cinco fases (López, 2009): I- las células viables presentes en los bordes de la lesión migran a lo largo de la membrana basal para cubrir rápidamente esta zona. Histológicamente, se observa un epitelio aplanado cubriendo parte de la membrana basal. II- las células basales y las células secretoras no ciliadas son las *"células madres"* encargadas de restituir a las células epiteliales dañadas. Estas células entran en mitosis y las células hijas aún sin diferenciar migran a través de la membrana basal hasta la zona lesionada del epitelio. Histológicamente en esta zona de restitución observamos figuras mitóticas en la mucosa bronquial en los bordes de lesión (Kim y cols., 2005). III- las células hijas o preciliares maduran y adoptan una forma cuboidal y se disponen en la pared bronquial para diferenciarse más tarde en células ciliadas o en caliciformes.

Histológicamente, en esta fase de proliferación celular, se observa una leve hiperplasia de la mucosa en la zona dañada debido al hacinamiento de las células. Durante esta fase se estima que puede haber en torno a un 20-30% más de células que en el epitelio normal. IV- a continuación se produce una fase de reorganización de la población celular eliminando cualquier exceso de células mediante procesos de apoptosis (Li y cols., 2004). Histológicamente, se observa una pared bronquial más o menos normal pero existen algunas células descamadas y leucocitos en la luz del bronquio. V- Finalmente, el epitelio dañado es reparado y se restablece tanto la estructura como la función normal de la mucosa bronquial. Histológicamente, observamos un epitelio bronquial normal y solo aparecen algunas células descamadas e inflamatorias en los espacios broncoalveolares (Busse y cols., 1999; Davies y cols., 2003).

Dependiendo del tipo de exudado, las bronquitis pueden ser serosas, catarrales, purulentas, fibrinosas, fibrinonecróticas y algunas veces granulomatosas (López, 2006). En algunos casos, además de la hinchazón celular y la pérdida de anclaje, el citoplasma de las células infectadas por virus se fusiona formando las típicas células multinucleadas o sincitiales, que no deben confundirse con las células gigantes multinucleadas formadas por la fusión de macrófagos que se presentan comúnmente en las bronconeumonías (López, 2009).

En animales con daño viral o expuestos a gases tóxicos se puede observar otro tipo de cambio degenerativo y es la separación de la placa ciliar con forma de “penacho o pestaña” del resto de la célula por un proceso de fragmentación celular conocido con el nombre de cilicitoforia. El resto de la célula que contiene el núcleo y parte del citoplasma adquiere una forma redondeada, pudiendo confundirse con macrófagos o células mononucleares (López, 2009)

Cuando el daño bronquial se vuelve crónico, el epitelio pseudoestratificado ciliar sufre una hiperplasia de células caliciforme o metaplasia a epitelio escamoso, menos especializado pero más resistente (Aarbiou y cols., 2004). Las células caliciformes proliferan y como consecuencia secretan una mayor cantidad de moco (inflamación catarral crónica). Este hecho puede considerarse como un mecanismo de defensa, sin embargo en algunas ocasiones este exceso de moco no se puede eliminar fácilmente de las vías aéreas, dando lugar a una bronquitis obstructiva crónica (Jeffery, 2001; López, 2006, López, 2009).

En pulmones con daños crónicos además podemos observar los Cuerpos de Creola, que se forman por la aglomeración de células epiteliales que se desprenden hacia la luz bronquial (López, 2009*).*

Así como el epitelio bronquial reacciona al daño prolongado produciendo hiperplasia caliciforme y/o metaplasia escamosa, de la misma forma las glándulas bronquiales reaccionan aumentando su tamaño y el volumen de sus secreciones. Estas glándulas sufren procesos de hiperplasia e hipertrofia, sin embargo en estudios microscópicos de rutina resulta difícil de evaluar ya que debemos tener en cuenta las variaciones entre especies y que el tamaño de la glándula varía en función del tamaño del bronquio. Una forma de evaluar el tamaño de las glándulas bronquiales en humanos es estableciendo la relación normal o índice entre el tamaño glandular y el grosor de la pared bronquial. Este índice se conoce como índice de Reid, y en individuos con bronquitis crónicas se describe un elevado índice de Reid (Oberholzer y cols., 1978).

Los mecanismos que gobiernan la hiperplasia bronquial son complejos y afectan tanto a las células epiteliales como las mesenquimales, así como numerosos mediadores químicos. La remodelación tisular incluye inflamación, modificación de matrices extracelulares, hipertrofia, hiperplasia y apoptosis. Los cambios más relevantes incluyen la hiperplasia caliciforme, depósito de

colágeno y engrosamiento de la lámina reticular, hiperplasia del músculo liso, neovascularización y proliferación de terminaciones nerviosas. Estos cambios morfológicos suelen manifestarse antes de la presentación de los signos clínicos (López, 2009).

En los bronquios que sufren una obstrucción o una inflamación crónica y severa se puede desarrollar una bronquiectasia, que consiste en una dilatación patológica e irreversible de los bronquios como resultado de la acumulación de exudado en la luz y rotura de la pared bronquial (López, 2006). Este proceso se divide en dos grandes grupos: la bronquiectasia obstructiva y la no obstructiva. La primera se produce en la porción distal de un bronquio obstruido por un tumor o cuerpo extraño, la segunda se debe fundamentalmente a una infección pulmonar crónica, donde las enzimas proteolíticas, liberadas por las células fagocíticas durante la inflamación, degradan y debilitan el musculo liso y el cartílago que ayudan a mantener el diámetro normal de los bronquios y esto unido a la tracción que ejerce el tejido pulmonar adyacente, da lugar a la dilatación del tubo bronquial. Además puede ser sacular, cuando afecta a una pequeña porción de la pared del bronquio, o cilíndrica cuando se ve involucrado un segmento más amplio. Microscópicamente, en la bronquiectasia se observa exudado purulento o necropurulento rodeado de tejido conectivo entremezclado con restos de cartílago, músculo liso y restos de tejido glandular infiltrado por abundantes neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas (López, 2006; 2009).

2.2.4.2 INJURIA Y RESPUESTA BRONQUIOLAR

Los bronquiolos son especialmente sensibles al daño causado por virus respiratorios y por inhalación de gases oxidantes y sustancias tóxicas. La explicación exacta de por qué el epitelio bronquiolar es tan propenso a las lesiones aún no se conoce con claridad, pero presumiblemente se deba en parte a que 1) es un epitelio muy vulnerable a los radicales libres, 2) las células de Clara generan a nivel local gran cantidad de metabolitos tóxicos y 3) la tendencia de los macrófagos alveolares y leucocitos de acumularse a este nivel (López, 2006).

En los casos de daño agudo, las células afectadas pierden su anclaje, desprendiéndose hacia la luz bronquiolar y dando lugar a úlceras focales en las membranas basales. La liberación de mediadores químicos desencadena la llegada de neutrófilos y células plasmáticas durante las primeras 24 horas posteriores a la lesión. Estos cambios van seguidos por la aparición de infiltrados mononucleares. En condiciones óptimas, la necrosis bronquiolar es seguida por la eliminación del tejido dañado, hiperplasia epitelial y finalmente reparación. Estos mecanismos de reparación son menos efectivos en los bronquiolos que en los bronquios, debido a que las paredes de los primeros son menos rígidas y por lo tanto más susceptibles al colapso (López, 2006; 2009).

Dependiendo del tipo de daño y de la respuesta inflamatoria, las bronquiolitis se pueden clasificar en catarrales, supurativas, necróticas o granulomatosas. En los daños severos, el exudado no puede ser eliminado de la luz de los bronquiolos, por lo que se infiltra de fibroblastos formando estructuras de tejido fibrovascular bien organizado. Estos pólipos en la luz de los bronquiolos de forma eventual se recubren de células ciliadas. Esta lesión recibe el nombre de bronquiolitis obliterante y se observa con frecuencia en pulmones de animales con bronconeumonía o neumonías broncointersticiales crónicas (López, 2006). En porcino, se han descrito lesiones de bronquiolitis obliterante en animales infectados con PCV2 (Cheng y cols., 2011).

Por otro lado, si la infección es moderada pero persistente, se desencadenan una serie de mecanismos que incluyen inflamación crónica mediada por varios tipos de células inflamatorias como los eosinófilos, linfocitos CD4, células plasmáticas y células cebadas entre otras, así como por numerosos mediadores químicos y factores de crecimiento epitelial, haciendo que las células caliciformes, normalmente ausentes en los bronquiolos, proliferen a partir de las células basales, dando lugar a una metaplasia caliciforme. Este hecho provoca alteraciones importantes en las propiedades fisicoquímicas de las secreciones bronquiolares y clínicamente se manifiesta como una hipersecreción de moco que tapona la luz bronquiolar causando signos respiratorios severos a pesar de que las lesiones macroscópicas son poco aparentes. Microscópicamente, se observan tapones de moco en la luz bronquiolar y gran cantidad de células caliciformes en la mucosa de los bronquiolos, acompañada de una inflamación leve y un engrosamiento de las paredes bronquiolares con infiltrado de eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas (López, 2006).

2.2.4.3 INJURIA Y RESPUESTA ALVEOLAR

Los neumocitos tipo I, que forman parte de la estructura de la pared alveolar, son especialmente vulnerables a los agentes nocivos que alcanzan la región alveolar vía aérea o sanguínea. El daño en los neumocitos tipo I causa hinchazón y vacuolización de estas células. Cuando el daño se vuelve irreversible, las células se desprenden y dejan la membrana basal desnuda, incrementando la permeabilidad de la pared y provocando edema alveolar (López, 2006).

La reparación alveolar es posible siempre y cuando la membrana basal permanezca intacta y la lesión no se complique con infección. Al tercer día de producirse la lesión, los neumocitos tipo II, células precursoras y más resistentes al daño, comienzan a dividirse dando lugar a un gran conjunto de células indiferenciadas. Estas células recubren la membrana basal desnuda de la pared alveolar y finalmente se diferencian en neumocitos tipo I. Cuando el daño alveolar es difuso, la proliferación de neumocitos tipo II se vuelve tan espectacular que a nivel microscópico adquiere un aspecto glandular o de pulmón fetal. Esta hiperplasia de neumocitos tipo II también recibe el nombre de epitelización o fetalización (López, 2006) y, aunque forma parte de la reparación alveolar normal, puede interferir en el intercambio gaseoso y causar hipoxia. Los neumocitos tipo I son uno de los tres componentes de la barrera hematogaseosa, de manera que, cuando estas células epiteliales se dañan, tiene lugar un incremento de la permeabilidad capilar alveolar, permitiendo la salida de plasma, proteínas y fibrina hacia la luz alveolar. En condiciones normales este material es eliminado rápidamente vía linfática y las proteínas y los hilos de fibrina son fagocitados por los macrófagos alveolares. Si el daño es permanente o severo, los fibroblastos pueden proliferar en las paredes alveolares a nivel intersticial, provocando una fibrosis, mientras que en otras formas de daño severo estos fibroblastos pueden migrar desde el intersticio llegando a la luz alveolar y provocar una fibrosis intraalveolar. Estos tipos de fibrosis se observan con mayor frecuencia en casos de intoxicación o alergias, comprometiendo seriamente la función pulmonar (López, 2006). La respuesta inflamatoria del alveolo también está regulada por numerosas células inflamatorias y mediadores químicos. Investigaciones recientes sugieren que el movimiento de células inflamatorias y secreción de citoquinas está regulada por señales bidireccionales entre los leucocitos y las células alveolares (López, 2006).

2.3 COMPLEJO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS PORCINAS (PRDC)

El término de Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas (*porcine respiratory disease complex,* PRDC) describe un síndrome caracterizado por bajo peso, disminución en la eficacia de la conversión alimentaria, anorexia, letargia, fiebre, tos y dificultad respiratoria que afecta principalmente al ganado porcino entre las 14-22 semanas de edad (Halburg, 1998; Thacker, 2001a).

Actualmente, este complejo representa un grave problema en la producción porcina de todo el mundo. Es un síndrome multifactorial causado por la interacción de distintos patógenos (Harms y cols., 2002; Kim y cols., 2003b; Opriessnig y cols., 2007; Fachinger y cols., 2008). Así, la presentación del PRDC es extremadamente variable entre países, regiones, granjas y distintos sistemas de producción, e incluso a lo largo del tiempo dentro de una misma explotación viéndose influenciada por las condiciones ambientales, de manejo en la explotación y factores genéticos, que en conjunto condicionan la severidad del mismo (Dee, 1996; Brockmeier y cols., 2002, Bochev, 2007) (Ilustración 7).

En la mayoría de las explotaciones con PRDC, los patógenos aislados con mayor frecuencia son el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSv, *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus*), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh), Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2, *Porcine Circovirus type 2*), virus de la Influenza Porcina (SIv*, Swine Influenza virus*), así como otros agentes patógenos víricos o agentes bacterianos, comensales habituales del sistema respiratorio.

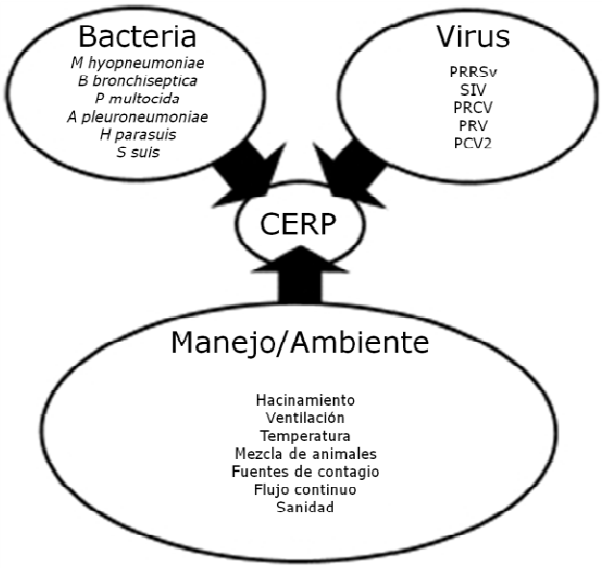


Ilustración 7: Interacción viral, bacteriana y de condiciones ambientales dando como resultado el desarrollo del PRDC. (CERP *Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas;* PRCv *Coronavirus respiratorio porcino*; PRv *Virus de la pseudorrabia*). Traducido de Brockmeier (2002).

Thacker (2006), especifica al PRDC como una neumonía enzoótica (en la que participa *Mycoplasma spp* y bacterias oportunistas) agravada por varios virus respiratorios. Propuesta reforzada por las observaciones de Hansen y cols., (2010c) en un trabajo centrado en la patología y patógenos asociados al PRDC donde se describen diez combinaciones de patógenos identificados más frecuentemente, entre los que destaca PCV2, Mh, *Mycoplasma hyorhinis* y *Pasteurella multocida*, siendo Mh significativamente prevalente en los casos de bronconeumonía, describiéndose en coinfección con PRRSv o *Streptococcus suis.* Otros autores también describen a Mh como el agente patógeno más comúnmente involucrado (Fablet y cols., 2012a; Hillen y cols., 2014).

También se ha descrito a PCV2 como el agente viral más frecuentemente identificado (Chiou y cols., 2004; Palzer y cols., 2008; Hansen y cols., 2010c). No obstante, cabe mencionar que la mera identificación de PCV2 no significa que esté asociado con enfermedad, atendiendo a que este virus ha sido identificado en animales sanos así como en animales infectados subclínicamente (Opriessnig y cols., 2007).

La divergencia en la proporción de los patógenos en los estudios mencionados podrían estar condicionados por varios factores, tales como: los métodos de identificación utilizados, diferencias en el estatus sanitario de las explotaciones, manejo, variaciones estacionales o simplemente ser el reflejo de la naturaleza compleja del PRDC (Sorensen y cols., 2006).

Los diferentes agentes producen una clínica muy similar, lo cual hace imprescindible la utilización de técnicas laboratoriales para poder realizar un correcto diagnóstico. La rapidez de éste es fundamental para la identificación del/los agente/s etiológico/s primario/s implicado/s, para la implementación de medidas terapéuticas y/o preventivas, permitiendo así minimizar las pérdidas económicas producidas por este complejo (Halburg, 1998).

2.3.1 ETIOLOGÍA

A efectos de estudio, los distintos agentes etiológicos que participan en la presentación del PRDC se pueden dividir en dos grandes grupos: patógenos bacterianos y patógenos víricos.

Las neumonías bacterianas son las más comunes en las vías respiratorias altas, caracterizada por la infección subclínica con bacterias potencialmente patógenas. La mayoría de ellas son comensales de la mucosa nasofaríngea o tonsilas palatinas, lo que convierte a estos animales en portadores de uno o varios patógenos pulmonares.

Los patógenos bacterianos a su vez se pueden agrupar en tres categorías, según su virulencia y/o ruta de infección. Así, tenemos:

1. Los que penetran por vía aerógena y poseen factores de virulencia que, de forma primaria, comprometen las defensas naturales del pulmón y que serían: Mh, agente etiológico de la Neumonía Enzoótica Porcina (NEP) (Maes y cols., 1996), *Actinobacillus pleuroneumoniae* (App) (Rycroft y Garside, 2000) y *Bordetella bronchiseptica* (Jong, 2006).
2. Los que penetran por vía aerógena y que, secundariamente, pueden no inducir neumonía cuando se inoculan intratraquealmente, porque requieren de un daño previo de los mecanismos de defensa o limpieza pulmonar para proliferar e inducir neumonía; siendo los más comunes *Pasteurella multocida* (Ross, 2006), *Streptoccoccus suis* (Staats y cols., 1997), *Haemophilus parasuis* (Oliveira y Pijoan, 2004), *Mycoplasma hyorhinis* (Ross, 1973) y *Actynomices pyogenes* (Jost y Billington, 2005).
3. Los que alcanzan el pulmón vía sanguínea como consecuencia de una bacteriemia o septicemia; los más frecuentes son *Salmonella choleraesusis* (Griffith y cols., 2006), *Actinobacillus suis* (Rycroft y Garside, 2000) y *Actinomyces pyogenes* (Jost y Billington, 2005).

Otros patógenos que pueden verse involucrados en la presentación de este complejo son los agentes víricos, que también se pueden dividir en tres grupos desde una perspectiva etiopatogénica:

1. Los virus patógenos que, por sí solos, tienen capacidad de inducir lesiones y enfermedad clínica y que incluye el PRRSv (Lunney y cols., 2010), SIv (Halburg, 1998), Coronavirus respiratorio porcino (*Porcine respiratory coronavirus* PRCv) (Laude y cols., 1993) y el virus de la pseudorrabia (*Pseudorabia virus* PRV) (Kluge y cols., 1992).
2. Clasificados como agentes oportunistas, se encontrarían los virus que inducen normalmente una enfermedad subclínica, manifestando clínica aquellos animales que estén inmunocomprometidos o cuando la infección esté complicada por bacterias y/u otros virus. En este grupo se incluye el Citomegalovirus (*Porcine Cytomegalovirus* PCMV) (Yoon y Edington, 2006) y el PCV2 (Gillespie y cols., 2009); si bien, algunos autores proponen a este último como un agente del primer grupo (Segales y cols., 1997a; Ellis y cols., 1998).
3. Aquellos patógenos que solamente, bajo ciertas circunstancias, están asociados con la enfermedad respiratoria. Aquí se podría encuadrar Paramyxovirus (Kirkland y Stephano, 2006), el virus de la encefalomiocarditis (Koenen, 2006) y el virus de la encefalomielitis hemaglutinante (Pensaert, 2006) y Adenovirus (Kleiboeker, 2006).

Otra clasificación de los agentes etiológicos que participan en la presentación del PRDC se basa en 3 modelos de interacción etiopatogénica (Iglesias y Trujano, 2000):

1. Virus o *Mycoplasma* – Bacteria (Patógeno cuyo único lugar de colonización es el tracto respiratorio). El primer patógeno altera o modula los mecanismos de defensa de las vías respiratorias (Mh o virus) y, en estas condiciones, el patógeno bacteriano comensal causa daño severo. Un ejemplo de este tipo de interacción sería la coinfección entre Mh y *P multocida* (Ciprian y cols., 1988).
2. Virus – Bacteria (germen que normalmente no colonizan el tracto respiratorio). Un ejemplo sería la interacción entre PRRSv y *Salmonella cholerasuis* (Wills y cols., 2000).
3. Virus – Virus o la interacción Mh – virus. Ejemplos frecuentes de este tipo de interacción son Mh-PRRSv (Thacker y cols., 1999) o PRRSv-SIv (Kay y cols., 1994).

Independientemente de la categoría a la que pertenezcan, es necesario hacer un diagnóstico diferencial teniendo en cuenta las características clínicas, epizootiológicas, lesionales y laboratoriales (Stevenson, 1998).

2.3.2 PREVALENCIA

No existen suficientes datos sobre la prevalencia del PRDC a escala mundial, ya que las manifestaciones de este complejo son muy variables y dependen de las condiciones de la explotación. Algunos autores describen una prevalencia del 58% (Brockmeier y cols., 2002), aunque dependiendo de los trabajos consultados, la prevalencia observada puede variar entre 25-75% (Hansen y cols., 2010c). Este complejo fue descrito por primera vez en Estados Unidos (Halbur y cols., 1993a) y entre 1993 y 2000 se observó un incremento de la incidencia de neumonía causada por PRRSv (13), Mh (4), SIv (6), *P multocida* (3) y *S. suis* (3 veces). La prevalencia de PCV2 en este mismo periodo se incrementó en 456 veces, mientras que App no registró un aumento de la prevalencia (Halbur, 2001). Los datos aportados por el Laboratorio Veterinario de Diagnóstico de la Universidad de Minnesota (2000-2001), evidenciaron que en el 88,2% de 2872 muestras de pulmones con lesiones neumónicas, se aislaron 2 o más

microorganismos, siendo las combinaciones más frecuentes PRRSv ó SIv asociado con algún agente bacteriano o vírico. En el caso de PRRSv, las combinaciones más frecuentes fueron: PRRSv-*P multocida* (10,4%), PRRSv-Mh (7%), PRRSv-App (6,2%), PRRSv-*H. parasuis* (6,1%) y PRRSv-PCV2 (2,3%). Por su parte SIv apareció en combinación con *P multocida* (5,2%), Mh (4,3%), PRRSv (3,8%) y PCV2 (1,9%), aislándose con mayor frecuencia el serotipo H3N2 (50,1%), seguido del H1N1 (47,8%) y H1N2 (1,7%) (Choi y cols., 2003).

En estudios serológicos realizados en España entre 1997 y 2000, se describió la presencia de PRRSv mediante RT-PCR en un 47,3% y seropositividad frente al PRRSv en un 56,6% en cerdos que presentaban síndrome multisistémico de adelgazamiento post destete (*post-weaning multisystemic wasting syndrome* PMWS) (Segalés y cols., 2002). Además, se demostró la presencia de PCV2 en estos animales afectados con PMWS (100% mediante ISH) y una seroprevalencia del 73,9%, aunque también se ha descrito su presencia en explotaciones no afectadas (Segalés y cols., 2002; Sibila y cols., 2004). En 2010, se determinó la seroprevalencia para PRRSv y SIv en 44 explotaciones localizadas en Barcelona, Girona, Lleida, Aragón y Murcia, observándose de forma combinada en el 85% de los reproductoras, 50% verracos y 80% en porcinos de engorde, así como la presencia concurrente de Acs para PCV2, PRRSv y SIV en el 89% de las reproductoras y 66% de los animales de cebo (López-Soria y cols., 2010). Calsamiglia y Pijoan (2000) observaron que entre el 24 y el 56% de las reproductoras presentaban Acs para Mh en un sistema de tres fases, mientras que Sibila y cols., (2007) encontraron prevalencias menores al 11% no detectándose diferencias entre los sistemas de producción. Por otra parte, se han asociado algunas prácticas de manejo, como todo dentro-todo fuera en las salas de parto, a menores seroprevalencias de Mh (Grosse Beilage y cols., 2009). A nivel nacional se ha demostrado la presencia de Acs frente SIv en el 83% de explotaciones (explotaciones que no aplicaban vacunación) y en el 76% de los animales evaluados (Maldonado y cols., 2006).

En los últimos 20 años, la cría intensiva de porcino se ha venido desarrollando en recintos cerrados, quedando estos animales expuestos continuamente a diversos contaminantes vehiculados por el aire, como el polvo, gases tóxicos, micotoxinas y endotoxinas que conducen a múltiples enfermedades respiratorias (Sorensen y cols., 2006). Sin embargo, en los animales criados al aire libre no parecen haberse resuelto estos problemas (Cabaret 2003; Risco y cols., 2015).

Uno de los principales factores que se deben tener en cuenta en el CNC es la diversidad de la estructura de sus explotaciones, encontrándonos un amplio abanico que va desde explotaciones de carácter reducido o familiar, en ocasiones con unas instalaciones muy deficiente, hasta núcleos de producción más amplios y con un mejor diseño y manejo. Esta diversidad de la estructura de las explotaciones, con presencia de numerosas explotaciones de muy pequeño tamaño se traduce en diversidad de programas sanitarios y en la mayoría de las ocasiones los ganaderos no realizan un programa preventivo de vacunación a sus animales frente a ninguna enfermedad.

Numerosos autores han intentado determinar la seroprevalencia frente a varios de los agentes involucrados en el PRDC (Mh, PRRSv y PCV2) en animales criados al aire libre como el jabalí presente fuera (Corn y cols., 2009; Baker y cols., 2011; Baroch y cols., 2015) y dentro de Europa (Vengust y cols., 2006; Reiner y cols., 2009; Hälli y cols., 2012; Hammer y cols., 2012; Marinou y cols., 2015; Stephenson y cols., 2015), incluida España (Vicente y cols., 2002; Ruiz-Fons y cols., 2006; Closa-Sebastià y cols., 2011; Boadella y cols., 2012), así como el cerdo ibérico criado en España. Estos animales podrían emplearse como modelos para el CNC, atendiendo a que también presentan una elevada rusticidad, encontrándose perfectamente adaptados a su entorno y que en algunos casos se crían en sistemas de producción en extensivo o semi-intensivo similares a los descritos para el CNC.

En algunos de estos trabajos no fue posible la detección de varios agentes, aquellos en los que se observó seroprevalencia frente a varios agentes patógenos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1: Detección de varios agentes patógenos respiratorios en animales de vida libre (jabalí y cerdo ibérico). Estudios de seroprevalencia realizados fuera de Europa (*) y en países europeos (**), incluida España (***) para la detección de Acs frente a Mh, PRRSv y PCV2.

AGENTES PATÓGENOS DETECTADOS	REFERENCIAS
Mh / PRRSv / PCV2	*Baker y cols., 2011**
	*Closa-Sebastià y cols., 2011****
Mh / PRRSv	*Marinou y cols., 2015***
PRRSv / PCV2	*Corn y cols., 2009**
	*Stephenson y cols., 2015**
	*Baroch y cols., 2015**
	*Reiner y cols., 2009***
	*Hammer y cols., 2012***
	*Roic y cols., 2012***
	*Boadella y cols., 2012****

2.3.3 PATOGENIA

Los mecanismos patogénicos del PRDC aún permanecen sin conocerse completamente. Los patógenos bacterianos y víricos primarios poseen factores de virulencia que les permiten superar el sistema de defensa natural de las vías respiratorias y causar enfermedad por sí mismos.

Algunos de los mecanismos mediante los cuales los agentes primarios alteran la defensa de las vías respiratorias incluyen (Ilustración 8):

- ✓ daños en el epitelio ciliado de las vías respiratorias,
- ✓ alteración de la función de los macrófagos pulmonares,
- ✓ producción de adhesinas que pueden ser utilizadas por otras bacterias para unirse al epitelio respiratorio,
- ✓ efectos inmunomoduladores.

Además, varios microorganismos pueden ejercer de manera conjunta su patogenia alterando las barreras de defensas y haciendo que las vías respiratorias sean susceptibles a la acción de otros organismos menos patógenos.

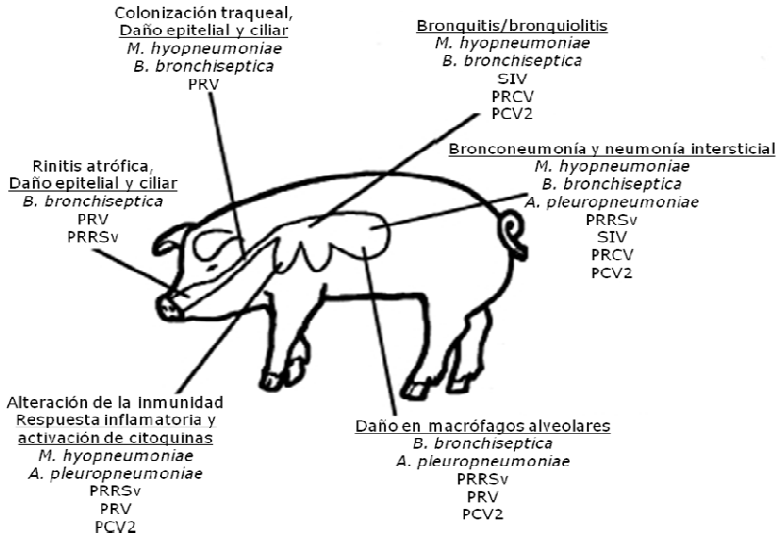


Ilustración 8: Áreas y mecanismos de defensa que pueden verse afectados por los distintos agentes patógenos respiratorios. Traducido de Brockmeier (2002).

Es importante recordar que la interacción entre los distintos agentes patógenos juega un importante papel a la hora de determinar la severidad de la enfermedad respiratoria.

Los distintos modelos de interacción han sido estudiados empleando protocolos de inoculación experimental. A continuación se recogen algunos ejemplos, detallando la patogenia de los mismos:

En la interacción entre **Mh y *P multocida***, se observó como al inocular con Mh y posteriormente con *P. multocida*, las lesiones producidas por Mh se vieron potenciadas por *P. multocida* (Smith y cols., 1973; Ciprian y cols., 1988). El incremento de la susceptibilidad a *P. multocida* en cerdos infectados con Mh puede deberse a que Mh genera un proceso inflamatorio donde abunda la prostaglandina E2; prostaglandina que afecta la actividad de los polimorfonucleares, favoreciendo por tanto la proliferación de bacterias que pueden estar presentes en el aparato respiratorio (Asai y cols., 1996).

En la interacción entre el **PRRSv y App** se observó como al inocular con PRRSv y posteriormente con App, las lesiones producidas por este último eran más severas, quedando rodeadas por tejido sano, en donde fue posible detectar macrófagos positivos a PRRSv. En contraposición, al inocular App y posteriormente PRRSv, no se apreciaron diferencias significativas en las lesiones presentes en los animales inoculados con ambos agentes y los inoculados únicamente con App (Pol y cols., 1997).

En coinfecciones entre PRRSv y agentes bacterianos, PRRSv actúa como agente primario. Sin embargo, cuando se produce coinfección con un micoplasma, se ha evidenciado que éste último juega un importante papel como agente primario.

Mh y PRRSv son dos de los agentes aislados con mayor frecuencia en animales con PRDC. Los mecanismos patogénicos de ambos son muy diferentes. Por una parte, Mh es un agente bacteriano extracelular, que ejercen su efecto patógeno adhiriéndose a los cilios de las células cilíndricas ciliadas del epitelio respiratorio dañando por tanto, el epitelio y el aparato mucociliar (DeBey y cols., 1992). Así, Mh induce una neumonía broncointersticial, localizada y crónica con proliferación de tejido linfoide peribronquial. En contraposición, PRRSv infecta y se replica en las células de la línea macrófagos/monocitos/células dendríticas; produciendo una neumonía intersticial difusa, aguda y severa (Rossow y cols., 1995; Halbur y cols., 1996b; Thanawongnuwech y cols., 1997). Como ya se comentó anteriormente, los PAMs y PIMs son las células primarias de replicación del PRRSv en el pulmón (Halbur y cols., 1996a; Thanawongnuwech y cols., 1997). La lisis de éstos, inducida por la infección por PRRSv, presumiblemente da como resultado una disminución de la capacidad de las vías respiratorias para defenderse de agentes patógenos respiratorios o sistémicos (Galina y cols., 1994).

Además, Mh tiene un efecto inmunomodulador; estimula la proliferación de linfocitos, provocando una activación del sistema inmune y un reclutamiento de PAMs lo que contribuye, en caso de estar presente, a una mayor replicación del PRRSv, prolongando así la neumonía de origen viral (Thanawongnuwech y cols., 2001).

En inoculaciones experimentales se han obtenido resultados muy diversos. Por un lado, Van Alstine y cols. (1996) reportaron que PRRSv no tenía efecto exacerbante en la coinfección con Mh al inocular Mh y posteriormente con PRRSv. Sin embargo, Thacker y cols. (1999), demostraron que, en cerdos de 6 semanas de edad inoculados con Mh y PRRSv, se vio potenciada la neumonía producida por éstos; manifestándose un incremento significativo de la clínica, las lesiones macroscópicas y microscópicas en los animales inoculados con ambos agentes en comparación con los inoculados sólo con uno de ellos.

Al inocular Mh y después PRRSv, la clínica y las lesiones inducidas por PRRSv, se vieron potenciadas, perdurando más en el tiempo en comparación con aquellos animales inoculados únicamente con PRRSv, en donde las lesiones se habían resuelto 4 semanas después de la inoculación. Por otro lado, se observó como al inocular primero PRRSv los cerdos desarrollaron antes las lesiones macroscópicas compatibles con Mh, pero no aumentó el porcentaje total de tejido pulmonar afectado; si bien, microscópicamente el daño inducido a nivel celular fue mayor, con lesiones más severas, mayor proliferación de tejido linfoide peribronquial y perivascular inducido por Mh y mayor grado de neumonía intersticial inducida por PRRSv; en comparación con las lesiones observadas en los animales inoculados con un único agente (Thacker y cols., 1999).

La interacción entre **Mh y PCV2** también ha sido estudiada. En infecciones únicas de PCV2 las lesiones microscópicas observadas con mayor frecuencia son depleción del tejido linfoide y linfadenitis granulomatosa en las que se puede apreciar la presencia de células gigantes multinucleadas e histiocitosis, así como cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en los histiocitos infectados (Rosell y cols., 1999) (o ambas), así como la detección del Ags de PCV2 asociado a las lesiones linfoides (Sorden, 2000). Además produce una neumonía intersticial, hepatitis difusa y nefritis intersticial (Clark, 1997; Rosell y cols., 1999). Por su parte en infección por Mh, como ya se ha comentado anteriormente, las lesiones microscópicas fundamentalmente son proliferación o hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios, llegando esta a obliterar la luz de los bronquios. En estudios experimentales, se ha observado como en animales de 4 semanas de edad, al inocular Mh y luego PCV2, Mh potencia la severidad de las lesiones producidas por PCV2 en pulmón y linfonodos, presentándose una mayor depleción linfoide y linfadenitis granulomatosa en comparación con aquellos animales inoculados únicamente con PCV2. Además se detectó mediante inmunohistoquímica, la presencia de Ags de PCV2 en macrófagos y células dendríticas presentes en el tejido linfoide asociado a los bronquios, lesiones inducidas por Mh, lo que sugiere que este puede ser un lugar importante en la replicación de PCV2 en el pulmón (Opriessnig y cols., 2004).

En la interacción entre **Mh y SIv** (Thacker y cols., 2001; Yazawa y cols., 2004), el SIv infecta únicamente a las células del epitelio respiratorio. Al inocular animales con Mh y posteriormente con SIv, se observó como Mh no alteró de forma significativa el curso de SIv; ya que, si bien al principio las lesiones macroscópicas (3-7 días post-inoculación) y las lesiones de neumonía (14 dpi) eran mayores en los animales inoculados con Mh y SIv, a los 21 dpi la neumonía inducida por SIV ya se había resuelto y los niveles de bronconeumonía producida por Mh en los animales inoculados con Mh y SIv eran similares a los inoculados únicamente con Mh. Ambos agentes comprometen el funcionamiento del aparato mucociliar y al epitelio respiratorio, lo que en condiciones de campo potenciaría el desarrollo de infecciones por otros patógenos respiratorios oportunistas (Thacker y cols., 2001). En otro estudio fue posible observar lesiones de color rojo a púrpura en los pulmones de todos los animales, siendo el porcentaje de parénquima pulmonar afectado mayor en aquellos animales inoculados con SIv y Mh, en comparación con aquellos inoculados únicamente con Mh. Microscópicamente, el daño en las células epiteliales bronquiales únicamente pudo ser observado en aquellos animales inoculados con ambos agentes (Yazawa y cols., 2004).

Otra interacción observada con frecuencia es la producida entre **PCV2 y PRRSv** (Wellenberg y cols., 2003; Halbur y Opriesnig, 2004), produciéndose entre ellos una interacción de sinergismo (Harms y cols., 2001; Rovira y cols., 2002). PCV2, al igual que PRRSv, estimulan la producción de histiocitos y macrófagos dando lugar a una depleción linfocitaria en linfonodos y tonsila, acompañada probablemente de inmunosupresión (Krakowka y cols., 2002). La forma clínica más común de PCV2 es el

PMWS, observándose animales con disnea, linfadenomegalia generalizada, pérdida de peso, diarrea, entre otros sin acompañarse de fiebre y tos y afectando a animales más jóvenes (5-12 semanas) de lo que cabría esperar en los casos de PRDC (Harding y Clark, 1997; Allan y Ellis, 2000; Kim y cols., 2002). En Dinamarca, Vigre y cols. (2006), han establecido con mayor frecuencia la asociación de PCV2 con la forma americana de PRRSv, que con la forma europea.

La interacción entre **PRRSv y SIv** también ha sido estudiada, observándose resultados muy diversos. Por un lado, Van Reeth (1996) observó, que al inocular cerdos con la cepa europea de PRRSv y SIv, éstos desarrollaron una clínica más severa, lo que hace pensar que PRRSv aumenta el impacto patogénico de ambos. Estos agentes muestran tropismo por células diferentes en el pulmón, de manera que, parecería lógico pensar que al existir mayor cantidad de tejido pulmonar dañado, la presentación clínica y el patrón lesional en este tipo de interacción serán más severos. Sin embargo, Brun y cols. (1994), no observaron un aumento de la clínica, pero sí una mayor seroconversión a SIv en el grupo inoculado con ambos agentes, en comparación con los inoculados únicamente con SIv. Por otro lado, Pol y cols. (1997), también obtuvieron resultados ambiguos; en los animales primoinfectados con PRRSv y luego con SIV no se agravó la infección pero se hizo más crónica, llegando a detectarse SIv, mediante técnicas de inmunoperoxidasa (*immunoperoxidase monolayer assay*, IPMA) en los PAMs de lavado pulmonar incluso a los 21 dpi. Sin embargo, al inocularse simultáneamente ambos agentes no se observó este efecto, detectándose el virus sólo hasta el día 14 pi.

2.3.4 CLÍNICA

Al tratarse de una enfermedad compleja de carácter multietiológico, las manifestaciones clínicas son muy variadas y el periodo de incubación no está bien definido.

A continuación se recoge de forma resumida, la clínica observada en los distintos estudios experimentales de los modelos de interacción comentados en el apartado de Patogenia.

En la interacción entre **Mh y *P multocida***, los animales inoculados con ambos agentes mostraron fiebre alta, tos severa y disnea, con tendencia a agravarse. Además, estos animales tuvieron un mayor consumo de pienso (60% más de comida que los inoculados con un único agente). Si bien los animales inoculados únicamente con Mh mostraron un pico de fiebre en el día 26 pi (39,6ºC), los animales inoculados con ambos agentes presentaron picos a los 24 dpi (39,3ºC) y a los 28 dpi (39,2ºC) y los inoculados únicamente con *P multocida* no presentaron fiebre. En el caso de la tos y disnea, se observó como los animales inoculados con Mh mostraron tos moderada hasta el día 28 con tendencia a resolverse, y disnea en periodos de esfuerzo, mientras que los inoculados con ambos agentes mostraron tos severa a partir del día 32 y disnea también en fases de reposo (Ciprian y cols., 1988).

En estudios de interacción entre **Mh y PRRSv**, se observó como los animales inoculados con ambos patógenos mostraron clínica más severa. Así, entre los días 4-10 pi, estos animales mostraron leve disnea y/o taquipnea en reposo o moderada en estrés; mientras que en los inoculados únicamente con PRRSv la disnea y/o taquipnea fue leve e inexistente en los inoculados con Mh. Por otro lado, a los 14 dpi, aquellos animales inoculados con ambos agentes al mismo tiempo o primero con Mh mostraron una clínica más severa, presentando disnea y/o taquipnea moderada en reposo, en comparación con los inoculados primero con PRRSv donde la disnea y/o taquipnea fue moderada en periodos de estrés (Thacker y cols., 1999).

En la interacción entre **Mh y PCV2**, Opriessnig y cols. (2004), observaron como la presencia de Mh incrementó de forma significativa la severidad de la neumonía producida por PCV2, aumentando además la incidencia de PMWS. Los animales inoculados con ambos agentes mostraron una clínica respiratoria de leve a grave, caracterizada por un aumento significativo de la frecuencia respiratoria, letargia, tos y ocasionalmente estornudos en comparación con los animales inoculados únicamente con Mh. En los animales inoculados sólo con PCV2 no se observó tos.

En el estudio de la interacción entre **Mh y SIv**, únicamente, se observó diferencia significativa en la presencia de tos, presentándose durante más días en los animales inoculados con ambos agentes en comparación con los animales inoculados solo con SIv o Mh. En relación a la ganancia de peso, esta fue significativamente menor en todos los grupos inoculados (SIv, Mh, Mh-SIv) en comparación con el grupo control. En cuanto a la fiebre, se observó que los animales inoculados con SIv (solo o con Mh) presentaron temperatura rectal ≥ 40ºC durante más tiempo que los animales del grupo control o los inoculados únicamente con Mh (Thacker y cols., 2001).

En la interacción entre **PRRSv y PCV2**, los principales signos clínicos son la inactividad, anorexia y disnea, no observándose adelgazamiento (Harms y cols., 2002). En estudios experimentales, Rovira y cols. (2002) lograron reproducir la presentación de PMWS en animales de 5 semanas de edad mediante inoculación intranasal con PRRSv y PCV2, observando sintomatología de moderada a severa; con fiebre, retraso en el crecimiento y algunos casos de distrés respiratorio severo. La clínica fue mayor en los animales inoculados con PRRSv o PRRSv y PCV2, en comparación con el grupo control o los inoculados solo con PCV2. En otro estudio llevado a cabo por Harms y cols. (2001). Sin embargo, se observó sintomatología muy severa tanto en los animales inoculados con ambos agentes como en los inoculados únicamente con PCV2.

2.3.5 LESIONES MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS

Las lesiones observadas en pulmón durante la necropsia de los animales con PRDC, son muy variables y dependen de los agentes involucrados en la presentación del complejo, siendo una combinación de los patrones morfológicos específicos provocados por cada patógeno. Debido al importante papel de los micoplasmas en la presentación de esta enfermedad, por lo general los cambios causados por los demás patógenos irán en función del daño inducidos por éstos (Schwartz, 2002).

En infecciones puras de Mh los cambios macroscópicos principales son los de una bronconeumonía supurativa; caracterizada por consolidación craneoventral del parénquima pulmonar, principalmente en los lóbulos craneales y medio, adquiriendo una coloración que va del rojo-púrpura a rojo-marronáceo llegando a gris con áreas atelectásicas (Ross, 1999). Microscópicamente, se observa hiperplasia del BALT y neumonía broncointersticial caracterizada por la proliferación de neumocitos tipo II. Ocasionalmente, se observa edema alveolar y exudado de tipo purulento, con abundante presencia de infiltrado inflamatorio polimorfonuclear en vías aéreas y luz alveolar en las fases aguda de la infección.

Las lesiones macroscópicas en las infecciones puras por SIV son similares a las de Mh (Schwartz, 2002; Thacker, B 2002), si bien microscópicamente en este caso observamos neumonía de tipo intersticial, con leve a moderado infiltrado linfocítico peribronquial y perivascular.

En infecciones puras causada por PRRSv, la superficie pulmonar aparece inicialmente con áreas oscuras de coloración marronácea y engrosamiento de los septos, lo que confiere a los pulmones mayor consistencia (neumonía intersticial). Microscópicamente, se observa hiperplasia e hipertrofia de los neumocitos tipo II, infiltrado inflamatorio en las paredes alveolares con células mononucleares y exudado en la luz alveolar constituido por un infiltrado inflamatorio mixto (Rossow y cols., 1995).

En el caso de PCV2, las lesiones macroscópicas más características son linfadenomegalia generalizada y ausencia de colapso pulmonar, de consistencia firme y elástica a la palpación y áreas con una coloración que va de rojo a marrón en los casos más severos. Microscópicamente, estas lesiones se corresponden con depleción linfoide con histiocitosis; observando en ocasiones, infiltrado de células gigantes multinucleadas en el tejido linfoide, así como la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en los macrófagos. En los pulmones es frecuente observar neumonía intersticial difusa con infiltrado linfohistiocítico en los casos leves e infiltrado de células sincitiales multinucleadas en los casos tardíos o severos, con descamación parcial o completa del epitelio respiratorio y presencia de bronquiolitis obliterante, entre otras (Clark, 1997; Rosell y cols., 1999).

En la interacción entre **Mh** y agentes bacterianos como ***P multocida***, Ciprian y cols. (1988), observaron lesiones macroscópicas más extensas (22-26% del parénquima pulmonar afectado, con presencia de adherencias pleurales), en comparación con los inoculados únicamente con Mh (4-17% de parénquima pulmonar afectado) o con *P multocida* (3,3%).

Microscópicamente, las lesiones observadas en los animales inoculados únicamente con Mh fueron más proliferativas, mientras que en aquellos animales inoculados con ambos agentes las lesiones fueron más exudativas, hallazgo comúnmente observado en el caso de infecciones secundarias (Morrison y cols., 1985); demostrándose una vez más que *P multocida* se comporta como un agente infeccioso secundario (Ciprian y cols., 1988).

En coinfecciones donde Mh interactúa con algún agente viral se observa cómo, en el caso de PRRSv o PCV2, Mh potencia e incrementa la severidad de la neumonía intersticial inducida por éstos (Thacker y cols., 1999; Opriessnig y cols., 2004). Sin embargo, no ocurre lo mismo en el caso de la interacción entre Mh y SIv donde, si bien al principio de la infección las lesiones son mayores, éstas no se prolongan en el tiempo. Demostrándose por tanto que el grado de interacción entre Mh y un agente viral, variará en función de la naturaleza de este último (Thacker y cols., 2001).

Así, en inoculaciones con **Mh y PRRSv**, la presencia de Mh potenció las lesiones de neumonía intersticial características de PRRSv. A los 28 dpi con PRRSv, se mantuvo un elevado porcentaje de parénquima pulmonar afectado de neumonía intersticial, siendo de un 42,9% en los animales inoculados con ambos patógenos al mismo tiempo y de 15,6% en los inoculados con Mh y luego con PRRSv, en comparación con los inoculados solo con PRRSv (0,8%). A los 10 dpi, las lesiones de bronconeumonía supurativa características de Mh afectaron un mayor porcentaje de parénquima pulmonar (4,1%) en los animales inoculados con ambos agentes, aunque a los 28 dpi no se observó diferencia significativa en comparación con los infectados únicamente con Mh.

Microscópicamente, se observó que, al inocular ambos agentes conjuntamente o primero PRRSv, se potencia el daño a nivel celular. A los 28 dpi, las lesiones de neumonía intersticial y neumonía broncointersticial inducidas por PRRSv y Mh respectivamente, fueron más severas en estos animales, observándose neumonía de moderada difusa a severa multifocal y proliferación de tejido linfoide peribronquial y perivascular muy severa, en comparación con las lesiones observadas en los animales

inoculados con un único agente o primero con Mh y luego con PRRSv, donde las lesiones fueron leve neumonía multifocal y leve a moderada proliferación de tejido linfoide peribronquial y perivascular (Thacker y cols., 1999).

En el estudio de la interacción entre **Mh y PCV2**, Opriessnig y cols. (2004), observaron a los 21 dpi, un mayor porcentaje de parénquima pulmonar con lesiones (consolidación creaneoventral bien delimitadas compatibles con Mh) en los animales inoculados con ambos agente (22,53%), en comparación con los inoculados únicamente con Mh (12,6%) o PCV2 (0,45%). Si bien a los 35 dpi no existía diferencia significativa entre el grupo inoculado con Mh y PCV2 y los inoculados únicamente con Mh. Además, observaron una mayor linfadenomegalia (linfonodos inguinal superficial, mediastínicos, traqueobronquial y mesentéricos) en los animales inoculados con ambos agentes (3 veces el tamaño normal), en comparación con los inoculados únicamente por PCV2 (2 veces el tamaño normal).

Microscópicamente, también observaron un incremento de la severidad de las lesiones a nivel pulmonar. Si bien, todos los grupos inoculados presentaron neumonía intersticial con hiperplasia e hipertrofia de neumocitos tipo II y engrosamiento de las paredes alveolares con infiltrado de macrófagos y linfocitos, estas lesiones fueron de leves a moderadas en los inoculados con PCV2 y de leves a severas en los inoculados con ambos agentes. Las lesiones compatibles con Mh (infiltrado linfohistiocítico peribronquial y perivascular con formación de nódulos, exudado en la luz alveolar e infiltrado de células linfohistiocíticas en la lámina propia de las vías aéreas) fueron de moderadas a severas en todos los grupos inoculados con Mh (Mh, Mh-PCV2), sin existir diferencia significativa entre ellos (Opriessnig y cols., 2004).

Las lesiones microscópicas observadas en tejido linfoide también fueron significativamente mayores en los animales inoculados con ambos agentes, observándose moderada depleción linfoide y moderada inflamación histiocítica a granulomatosa, acompañada de una mayor detección de Ags virales mediante inmunohistoquímica (IHQ) en aquellos animales inoculados con ambos agentes (Opriessnig y cols., 2004).

En la interacción entre **Mh y SIv** pareció haber una mínima interacción entre ambos agentes a nivel macroscópico y microscópico, ya que; si bien a los 14 dpi, en los animales inoculados con ambos agentes las lesiones macroscópicas de neumonia fueron más extensas (11,4% del parénquima pulmonar afectado *vs* 3,3% en los animales inoculados con Mh o SIV), ya a los 21 dpi no se observaron diferencias significativas entre los grupos inoculados con Mh (7,6%) o SIV (1,1%) y el grupo inoculado con ambos (4,6%), siendo muy similares las lesiones inducidas por uno u otro agente.

Microscópicamente, tampoco se observaron diferencias notables en la severidad de las lesiones entre los animales inoculados con ambos agentes y los inoculados sólo con uno de ellos (Thacker y cols., 2001).

En coinfecciones entre **PCV2 y PRRSv**, Harms y cols. (2001), observaron en pulmones de animales inoculados con ambos agentes a los 21 dpi, lesiones macroscópicas similares, pero más extensas (80-85% de parénquima pulmonar afectado), que las observadas en animales inoculados sólo con PRRSv (20-25%) o PCV2 (<5%). Los pulmones más afectados presentaban coloración púrpura, ausencia de colapso, consistencia firme y aspecto carnoso al corte.

Microscópicamente, los animales inoculados con ambos agentes presentaban neumonía intersticial severa con desarrollo de bronquiolitis necrotizante. Esta combinación no se observó en los animales inoculados únicamente con PRRSv o PCV2, los cuales presentaban leve neumonía intersticial o bronquiolitis necrotizante, respectivamente. Además, los autores observaron severa depleción linfoide, necrosis hepatocelular e infiltrado de macrófagos en hígado, linfonodos, bazo, piel, riñones, estómago, íleon, yeyuno, duodeno y colon en los animales inoculados con PRRSv y PCV2; lesiones que no se observaron en los animales inoculados únicamente con PCV2, sugiriendo que PRRSv potencia la enfermedad inducida por PCV2. Rovira y cols. (2002), demostraron que la infección por PRRSv incrementa la replicación de PCV2, al detectar mediante hibridación in situ, una mayor cantidad de ácido nucleico de PCV2 en las células macrofágicas, endoteliales y mioepiteliales de los animales inoculados con ambos agentes que en los inoculados únicamente con PCV2.

2.3.6 DIAGNÓSTICO

Debido a la clínica inespecífica y a los distintos patrones lesionales macroscópicos observados, el diagnóstico de los agentes etiológicos involucrados en la presentación del PRDC requiere de técnicas laboratoriales. El diagnóstico debe iniciarse con la recogida de todos los datos clínicos y epidemiológicos posible de la explotación, edad, origen de los animales, inmunidad de los reproductores, plan de vacunación, morbilidad y mortalidad, entre otros (Honnold, 1999).

Los signos clínicos no pueden interpretarse, de manera independiente, con fines diagnósticos ya que, como se ha explicado anteriormente éstos son muy variables e inespecíficos debido a la naturaleza multietiológica de esta enfermedad.

El diagnóstico macroscópico constituye la principal prueba diagnóstica no laboratorial. Los hallazgos macroscópicos obtenidos durante las necropsias, así como la inspección en matadero, son de gran utilidad en el diagnóstico de esta enfermedad (Bochev, 2008).

El número de necropsias realizadas o de pulmones inspeccionados en matadero debe ser lo más representativo posible, en función del tamaño de la explotación y la prevalencia de la enfermedad, para poder comparar de resultados obtenidos (Thacker, B 2002). Si más del 15% de los pulmones inspeccionados durante las necropsias o en la inspección de matadero están afectados, la probabilidad de que la explotación esté afectada por neumonía enzoótica es considerable. Las explotaciones libres de Mh, rara vez presentarán lesiones neumónicas en más del 1% de los pulmones, y aún así, estás son insignificantes (Motovski, 2004).

2.3.6.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Dependiendo del método de diagnóstico laboratorial empleado, éste nos permitirá aislar y/o identificar a los agentes etiológicos involucrados en la presentación del complejo. En este caso se habla de métodos directos (cultivo, IHQ, PCR, etc). Por el contrario, los métodos empleados para demostrar la presencia de Acs específicos anti-(agente), para conocer así el estado inmunitario general de la explotación reciben el nombre de métodos indirectos. La decisión de qué método debe utilizarse, se establece a partir de los datos epizootiológicos y/o anatomopatológicos.

Ambos métodos tienen sus ventajas e inconvenientes:

Las principales limitaciones que poseen las técnicas directas es la representatividad ya que, por un lado la obtención de la muestra requiere del sacrificio del animal o su recogida en matadero y por otro la dificultad para testar un gran número de animales. Por estas razones, se debe disponer de técnicas indirectas o serológicas que permiten realizar el diagnóstico en un gran número de animales (Sorensen y cols., 2006).

Para conocer el estatus sanitario de una explotación de ganado porcino, los test utilizados con mayor frecuencia son los test serológicos. Las técnicas indirectas más utilizadas son: el enzimoinmunoensayo (ELISA) y menos frecuentemente, la inmunofluorescencia, IPMA y la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) (Bochev, 2008).

Las serologías mediante ELISA se pueden realizar de forma simultánea a grupos de animales de diferentes edades, en sistemas de producción de ciclo cerrado, calculando el tamaño muestral en función del tamaño de la explotación, independientemente de su estado de salud (serología transversal) o bien, a un grupo de animales durante todo el ciclo productivo (seroperfil), definiendo su estado sanitario a través del tiempo, y aportando información fiable sobre la protección del individuo por inmunidad maternal o sobre una fase de infección, así como el tiempo que tarda en producirse la seroconversión. Conocer estos parámetros permite diseñar una estrategia de control y prevención de la enfermedad para cada explotación.

Sin embargo, la toma de muestras para el estudio de poblaciones porcinas se sigue realizando a nivel individual, lo que supone un hándicap en la medida de la representatividad de la población, así como un elevado coste en diagnóstico y trabajo.

Las muestras obtenidas de animales vivos pueden ser secreción nasal, hisopos traqueales, lavados traqueobronquiales, suero sanguíneo y calostro (Bochev, 2008). Otra muestra empleada para la detección de agentes patógenos o Acs desarrollados frente a estos es la saliva (Prickett y Zimmerman., 2010) (Tabla 2).

Durante los últimos años ha aumentado el interés por desarrollar nuevas técnicas de muestreo y diagnóstico más rápidas, sencillas y menos costosas. Surge así, el empleo de fluidos orales obtenidos mediante cuerdas para la detección de Ags y Acs específicos frente a patógenos que forman parte del PRDC (Tabla 2). Estos Acs pueden ser producidos en tejidos linfoides asociados a la mucosa oral como la tonsila o pueden alcanzar la mucosa oral desde el sistema circulatorio. Diversos estudios experimentales han demostrado que el 75% de la población de un corral pueden ser muestreadas si la cuerda empleada para la toma de muestra de saliva se deja suspendida durante 20 min, aumentando hasta un 90% si durante el mismo tiempo suspendemos 2 cuerdas (Romagosa, 2011).

Tabla 2: Detección de agentes patógenos en saliva. Agentes patógenos que han sido identificados y/o aislados en saliva de cerdos, o se han detectado Acs frente a ellos. (*) Estudios en los cuales las muestras han sido tomadas mediante el uso de cuerdas colgando en los corrales. *(TTv, Torque teno virus)*

AGENTE PATÓGENO	TÉCNICA	REFERENCIA.
PRRSv	PCR	*Prickett y cols., 2008a**
	ELISA y IFA	*Prickett y cols., 2008b**
	ELISA	*Kittawornrat y cols., 2012**
	PCR	*Ramirez y cols., 2012*
		*Olsen y cols., 2013**
	ELISA/PCR	*Kittawornrat y cols., 2014**
PCV2	PCR	*Prickett y cols., 2011**
	PCR	*Ramirez y cols., 2012*
Influenza A	qRT-PCR	*Detmer y cols., 2011**
	PCR	*Ramirez y cols., 2012*
TTv	PCR	*Ramirez y cols., 2012*
App	ELISA	*Loftager y cols., 1993*

El jugo de carne o trasudado de músculo es otra alternativa al uso del suero para la detección de Acs y ha sido empleado en el estudio de numerosas enfermedades infecciosas en el porcino entre las que cabría destacar *Salmonella*, Aujeszky's disease virus, *Yersinia enterocolitica, Trichinella spiralis*, y PRRSV. Recientemente, se ha descrito la detección de Acs frente a PRRSv y PCV2 (Fabisiak y cols., 2013) y frente a *Salmonella* spp., Mh y PRRSv (Meemken y cols., 2014) en jugo de carne, empleado kits de ELISA comerciales. Fabisiak y cols. (2013), realizaron un estudio en jabalíes donde demostraron la presencia de Acs frente a PRRSv (0,7%) y de IgG e IgM frente a PCV2, observando infección reciente en un 2,8% de los animales e infección tardía en un 43,7% analizando jugo de carne con kits de ELISA comerciales.

En los animales salvajes se realizan con frecuencia estudios serológicos para determinar la prevalencia de diversos agentes patógenos. Sin embargo, la dificultad de obtener un número suficiente de muestras de suero adecuados es un problema importante.

Como alternativa a estas limitaciones, algunos autores han investigado la viabilidad del extracto de tejido pulmonar, atendiendo a su buena irrigación, como muestra en donde poder identificar también Acs (Ferroglio y cols., 2000). Estos autores, compararon la detección de Acs frente a *Brucella abortus* en suero sanguíneo y extracto de tejido pulmonar para verificar la factibilidad del uso de los extractos en animales salvajes (rebecos) y domésticos (vacas), observando una buena correlación entre la positividad del suero y del extracto de tejido pulmonar tanto en rebecos como en el ganado vacuno, si bien la detección de Acs en suero fue tres veces mayor que en los extractos. Concluyéndose en este trabajo que el extracto de tejido pulmonar parece un recurso adecuado en el control de la brucelosis.

En Suecia, esta técnica también fue aplicada en 56 cadáveres de Zorro Rojo (*Vulpes vulpes*), con el fin de identificar Acs frente a dos parásitos frecuentes en estos animales el ácaro *Sarcoptes scabiei*, causante de la sarna sarcóptica, y el protozoo intracelular *Toxoplasma gondii*, causante de la toxoplasmosis. En el 39% de los animales analizados se encontraron Acs contra *Sarcoptes scabiei* y en el 82% frente a *Toxoplasma gondii*, indicando la utilidad potencial del uso de fluidos de las canales para la detección de anticuerpos en animales de vida salvaje (Jakubek y cols., 2012).

Por otra parte, Torsten Mörner y cols., 1988, hicieron un estudio comparativo entre los Acs encontrados en suero y los extractos de tejido pulmonar, frente a *Francisella tularensis biovar paleártica*. Para ello se tomaron muestras de seis azores (*Accipiter gentilis*) infectados experimentalmente y cuatro castores europeos (*Castor fiber*). Conjuntamente se analizaron muestras procedentes de un estudio de campo realizado a 110 castores salvajes. En los resultados de los estudios experimentales hubo una buena correlación entre los Acs detectados en suero y en los extractos de tejido pulmonar. De esta forma, los extractos pulmonares parecen ser una alternativa para los estudios serológicos aunque con una menor sensibilidad en comparación con el uso del suero sanguíneo.

La sensibilidad y especificidad del uso de los extractos pulmonares para la detección de Acs frente a Mh mediante la realización de ELISA ha sido analizada en muestras pulmonares de porcinos, procedentes de matadero, de animales que presentaban lesiones neumónicas compatibles infección por Mh, e IHQ +. Al comparar los resultados de los ELISAs realizados con extracto pulmonar y suero sanguíneo se observó una sensibilidad del 73% y una especificidad del 100%, y del 93% y 100%, respectivamente al compararlo con los resultados de la IHQ, demostrando así que los extractos pulmonares son adecuados para la detección de Mh mediante ELISA (Díaz y cols., 2013).

2.4 PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL PRDC

En este apartado haremos una breve revisión bibliográfica de aquellos patógenos que, según Thacker E. (2002), influyen directamente en el sistema inmunológico a nivel respiratorio y que predisponen al hospedador a sufrir infecciones por parte de otros agentes menos patógenos. Nos centraremos en el estudio de Mh, como agente etiológico principal en la neumonía enzoótica porcina, así como de aquellos agentes víricos del primer y segundo grupo que con mayor frecuencia interaccionan con éste en el PRDC, concretamente PRRSv y PCV2.

2.4.1 MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE

2.4.1.1 ETIOLOGÍA

Mycoplasma hyopneumoniae (Mh) se encuadra dentro de la clase de los *Mollicutes,* organismos replicantes de forma autónoma más pequeños, carentes de pared celular, con genoma pequeño y bajo contenido de guanina + citocina en su ADN (Bove, 1993; Kobisch y Friis, 1996). El término micoplasma se usa a menudo como sinónimo de la clase *Mollicutes*, que se origina del Latín *mollis* (suave) *cutes* (piel), y significa "piel suave" (Nicolet, 1996).

Dentro del género *Mycoplasma* se agrupan una serie de organismos pleomórficos, gram negativos, que varían desde formas esféricas, ligeramente cocoides o piriformes hasta filamentosos helicoidales de 0,3 a 0,8 µm de diámetro pudiendo atravesar filtros entre 220 y 450 nm.

Mh es uno de los micoplasmas aislados con mayor frecuencia en la especie porcina junto con *Mycoplasma hyorhinis* (asociado a lesiones de poliserositis, pericarditis y artritis), *Mycoplasma hyosynoviae* (responsable de ciertas lesiones articulares) y *Mycoplasma flocculare* (muy extendido en el tracto respiratorio, sin que su papel patogénico esté bien definido). Otras especies que se encuentran ocasionalmente en el aparato respiratorio son *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma buccale*, *Acholeplasma laidlawii* y *Acholeplasma granularum*.

Mh se aisló y cultivó por primera vez en 1965 en Inglaterra, donde se le denominó inicialmente *Mycoplasma suipneumoniae* (Goodwin y cols., 1965) y también en EEUU (Maré y Switzer, 1965) donde lo denominaron como se mantiene en la actualidad.

Las dificultades en el aislamiento de Mh se deben, por una parte a sus características nutricionales que exigen un alto grado de pureza de los constituyentes del medio de cultivo, y por otra, a la presencia de otros microorganismos, menos *exigentes (M. hyorhinis*) que al metabolizar la glucosa acidifican el medio e impiden el crecimiento de Mh. El medio de cultivo base es el caldo FF introducido por Friis (1971) y modificado posteriormente por Ross y Whittlestone (1983). En cultivos primarios, Mh crece lentamente, produciendo una ligera turbidez y cambio de color ácido entre los 3 y 30 días de incubación, siendo su crecimiento más rápido cuando se incuba a 37ºC y en agitación continua.

Bajo condiciones óptimas, el tiempo de generación es de 10 horas, alcanzando títulos máximos a un pH cercano a 7,0 y antes de que el rojo fenol, utilizado como indicador, cambie de color. Generalmente los cultivos sufren varios pases en medio líquidos, hasta ser inoculados en medios sólidos e incubados en una atmósfera de dióxido de carbono al 5-10%.

En medios sólidos, las colonias se pueden comenzar a visualizar a los 2-3 días con forma irregular, sin centro típico como otras especies de micoplasmas, incrementando su tamaño hasta 0,25 – 1 mm de diámetro en 10 días a 37ºC. Mh resiste temperaturas de 30 a 45ºC, pero se destruye después de ser sometido, durante 5 minutos, a 50ºC, a diferencia con otras bacterias que pueden soportar hasta los 70ºC. Toleran bajas temperaturas, de –180ºC y el proceso de liofilización. El secado disminuye su viabilidad del 1 al 10%. También son ligeramente sensibles a la penicilina y lisozima, siendo muy sensibles a la lisis por shock osmótico, detergentes, alcholes y Acs específicos más complemento (Kobisch, 1987; Domenech y cols., 1995).

2.4.1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Mh ha sido descrito durante muchos años como agente etiológico primario de la neumonía enzoótica porcina (NEP), una neumonía crónica. Ha ido evolucionado hacia una evidente intensificación junto con la producción porcina, lo que ha favorecido mayores factores de riesgo. Existe un gran número de trabajos que evalúan y cuantifican los factores de riesgo, tanto en explotaciones que tienen la enfermedad de forma enzoótica, como en explotaciones libres de patógenos específicos (SPF), además de su impacto económico (Piffer y Ross, 1984; Straw y cols., 1985; Goodwin, 1985; Morrison y cols., 1986; Tillon y Kobisch, 1987; Straw, 1991; Beskow y cols., 1998).

Se encuentra distribuida mundialmente, con una prevalencia del 65-82% de los animales infectados (Grosse Beilage y cols., 2009; Fraile y cols., 2010; Fablet y cols., 2012a, b), afectando a la mayoría de los países con alta producción porcina y generando un importante impacto económico, principalmente por la disminución en los parámetros productivos y los costes de medicamentos (Maes y cols., 2008; Thacker y Minion., 2012). Trabajos realizados en una variedad de países indican que las lesiones típicas de la NEP se pueden observar en el 30-80% de los cerdos al sacrificio (Ross, 1999).

Con la finalidad de estudiar la prevalencia de la enfermedad, los grupos de investigación de referencia emplean distintos métodos entre los que se destacan: la evaluación en matadero de lesiones macroscópicas compatibles con NEP en pulmones y/o el uso de técnicas serológicas en granja o matadero.

Los métodos para evaluar la lesión neumónica en matadero, se pueden establecer teniendo en cuenta el volumen y el peso de la lesión que se evalúa tridimensionalmente, o la superficie del área lesionada para posteriormente cuantificarla (Hill y cols., 1992). Así, por ejemplo, en cerdos con un 20% de lesión pulmonar durante su vida, podría pesar 25 kg menos, o retrasarse en 25 días su envío a matadero si se desea alcanzar el peso adecuado (Noyes y cols., 1990).

En estudios serológicos, Young y cols. (1983), encontraron que el 60% las explotaciones de Iowa tenían Acs fijadores de complemento anti-Mh. Wallgren y cols. (1994), evaluaron la incidencia de la infección por Mh, en un total de 30 animales, durante el período de crecimiento. Correlacionaron la presencia de lesiones de NEP en matadero y Acs anti-Mh, resultando todos los animales seropositivos mediante un test de ELISA convencional. En 2002, Vicca y cols. describieron en explotaciones con clínica, una seroprevalencia en animales de 9 semanas del 8% y del 52% en animales de 18 semanas produciéndose la seroconversión entre la semana 12 y 15. En explotaciones con infección subclínica observaron una seroprevalencia del 2% y 24%, respectivamente, produciéndose en este caso la seroconversión entre la semana 15 y 18. Estos resultados demostraron que en explotaciones con infección clínica la seroprevalencia es mayor y los animales seroconvierten a edades más tempranas.

En animales de vida libre se ha detectado una prevalencia de Mh muy variable, en función de la técnica diagnóstica empleada, observándose una seroprevalencia comprendida entre 19,7% y 72,5% mediante ELISA, según indican los estudios referenciados en la siguiente tabla:

Tabla 3: Estudios de prevalencia de Mh realizados en animales de vida libre (jabalíes). Animales salvajes (*) o criados en explotaciones(**). *LTb, lavado traqueobronquial.*

Referencia	País	Periodo de estudio	Nº	Muestra	Prevalencia	Técnica diagnóstica
Vicente y cols., 2002	España	1999-2000	78*	Suero	0%	ELISA
Vengust y cols., 2006	Eslovenia	2003-2004	178*	Sangre	21%	ELISA (IDEXX)
Marois y cols., 2008	Francia	2002-2003	91* 171* 63*	Suero (S) LTb S/LTb	58% 9% 3,2%	ELISA de bloqueo (DAKO) PCR ELISA/PCR
Sibila y cols., 2010	España	2000-2008	428*	Suero Hisopo nasal Pulmón	21,5% 20% 8% 29%	ELISA (HIPRA) nPCR nPCR H&E
Baker y cols., 2011	Texas Oklahoma Arkansas Louisiana	sd	50*	Suero	32%	ELISA (IDEXX)
Closa-Sebastià y cols., 2011	España	2004-2007	273*	Suero	26,6%	ELISA
Halli y cols., 2012	Finlandia	2005-2008	274**	Suero	0%	ELISA (Oxoid)
Marinou y cols., 2015	Grecia	2012 y 2013	359**	Suero	72,5%	ELISA
Baroch y cols., 2015	Estados Unidos	2011 y 2012	162*	Suero	19,7%	ELISA (IDEXX)

- ✓ ***Coste Económico de la NEP.***

Las pérdidas económicas atribuibles a esta enfermedad están asociadas a la reducción de los índices de ganancia de peso y de eficiencia de alimentación.Varios trabajos han descrito las repercusiones económicas de esta enfermedad. En relación al índice de crecimiento, una reducción de un 12,7% entre los 50 y los 80 kg de peso vivo, supone pérdidas económicas de aproximadamente 2,80 dólares australianos (Pointon y cols., 1985). En una granja británica, Braude y Plonka (1975), estimaron un incremento de 0,75 libras por cerdo en el coste de producción asociado a un brote de NEP.

Algunos autores utilizan la fórmula propuesta por Straw y cols. (1989) para determinar el coste económico que supone esta enfermedad en una explotación porcina, teniendo en cuenta dos parámetros: ganancia media diaria (GMD) e índice de transformación (IT). Suponiendo una GMD en los animales afectados de 600 gramos y que la NEP produce una disminución del 15,9% en dicho parámetro, si no existiera aquélla, la ganancia sería de 695,4 g/día. Esto, traducido a tiempo de estancia en la explotación, implica 18 días más de permanencia para los animales afectados, con los costos que de ello se deriva.

En trabajos, donde se correlacionan las lesiones en matadero con la ganancia de peso se observó que, cuando se supera el 10% del volumen pulmonar neumónico, se pierde 41,1 gr de ganancia de peso día (Hill y cols., 1992) Por otra parte, las pérdidas económicas aumentan cuando la infección por Mh se produce simultáneamente con *P multocida* y App (Maes y cols., 1996).

Independientemente del método que se utilice, las pérdidas económicas son subestimadas, ya que no contempla las bajas en granja, las lesiones que sufrió el animal en fase temprana de su vida que no se observan al sacrificio, así como los gastos de medicación, etc. (Noyes y cols., 1990).

- ✓ ***Susceptibilidad.***

Mh es un microorganismo estrictamente específico del cerdo. Bajo condiciones de campo los animales jóvenes son los más susceptibles a padecer la NEP, la cual se manifiesta escasamente en animales adultos. No obstante, este comportamiento no está asociado a un efecto de resistencia con la edad (Kobisch y Friis, 1996).

Por otra parte, se ha observado que cuando una explotación libre de NEP se infecta con Mh todas las categorías pueden presentar neumonía aguda (Kobisch y Friis, 1996; Sibila y cols., 2007).

- ✓ ***Fuente de Infección-Mecanismos de transmisión.***

La transmisión de Mh no se conoce con exactitud, aunque se ha postulado que el contacto directo es la forma más probable. La transmisión se produce entre animales de un mismo lote, o en sistemas de ciclo cerrado, entre animales de diferentes edades. Una vez establecida, la infección de Mh puede permanecer en el tracto respiratorio de los animales hasta los 185 días (Fano y cols., 2005). Al ser una enfermedad persistente, los animales con infecciones subclínicas son capaces de infectar a los susceptibles (Ruiz y cols., 2002; Pijoan, 2005). Marois y cols., (2008) y Vengust y cols., (2006) han estudiado la transmisión horizontal entre cerdos salvajes y cerdos domésticos.

La propagación de la infección vía aérea ha adquirido una mayor importancia (Desrosiers, 2004). Los microorganismos son vehiculados en los aerosoles que se generan por los estornudos y toses y son exhalados por los animales (Stärk, 1999), dependiendo la supervivencia de Mh en el medio, de las condiciones meteorológicas o medioambientales (Maes y cols., 1996). Por otra parte, se ha observado que las probabilidades que tiene una explotación de infectarse está relacionada con la densidad porcina de la zona y la distancia existente entre ésta y las explotaciones vecinas, estableciéndose una distancia mínima entre explotaciones de 3 km (Goodwin, 1985).

La transmisión en la sala de cría es horizontal de madres a lechones. En particular, los lechones pueden infectarse a partir de madres que paren con un bajo nivel de Acs y son excretoras de Mh. Las cerdas con pocos partos suelen presentar niveles de Acs más bajos que las cerdas más viejas (Maes y cols., 1996; Fano y cols., 2005). Sin embargo, mediante PCR se ha demostrado que las cerdas entre el segundo y séptimo parto pueden presentar infecciones persistentes (Calsamiglia y Pijoan, 2000). Por otro lado, las cerdas adultas de granjas enzoóticamente infectadas no transmiten Mh a sus lechones (Clark y cols., 1991). La transmisión vertical (intrauterina) o lactogénica aún no ha sido demostrada (Maes y cols., 1996).

Asimismo, existe un contagio horizontal entre los reproductores. Las cerdas adultas y las primerizas infectadas pueden transmitir Mh a las cerdas de reposición, incluyendo aquellos animales vacunados (Pieters y Pijoan, 2006). En las salas de cebo, la transmisión se produce por la introducción de animales enfermos o portadores asintomáticos responsables de la persistencia de la infección. En sistemas de producción continua, la diseminación ocurre cuando animales jóvenes y adultos se ubican en corrales adyacentes (Sheldrake y cols., 1990).

- ✓ ***Factores de riesgo en la presentación de la enfermedad.***

En estudios de NEP, se ha demostrado que el riesgo de infección por Mh está asociado a numerosos factores de riesgo (Vangroenweghe y cols., 2015), tales como la distancia con explotaciones no SPF, el tamaño de las explotaciones, la densidad de la población porcina en áreas específicas (Stärk y cols., 1992), la estación en la cual se inicie el ciclo productivo, la presencia de reproductores en la explotación, la ausencia de programas de vacunación frente a Mh (Ostanello y cols., 2007), el periodo del año (temperatura y horas de luz) (Dee y cols., 2010) y los parámetros climatológicos (temperatura y precipitaciones medias diaria) (Segalés y cols., 2012), entre otros.

La presencia de Mh está restringida al tracto respiratorio del cerdo, principalmente en pulmón, aislándose muy rara vez de la cavidad nasal. Por tanto, y debido a este neumotropismo, las condiciones que afectan directamente al aparato respiratorio influirán en el desarrollo de la enfermedad.

En diversas experiencias los animales de 4 semanas de edad que no estuvieron sometidos a un medio ambiente muy desfavorable, incluyendo ventilación por debajo del mínimo (0,5 cfm/cerdo), temperaturas fluctuantes (15-27ºC), corrientes de aire frío (250 mt/min-13ºC) y mezcla continua de animales, no mostraron diferencias en su estado de salud con respecto a los controles, sometidos a un ambiente convencional, mostrando una ganancia de peso y conversión diarios semejantes (Noyes y cols., 1986; Noyes y cols., 1988). Clark y cols. (1993), tampoco encontraron diferencias lesionales, de seroconversión, ganancia o conversión alimenticia entre los lotes experimentales y control al investigar el efecto del medio ambiente en animales infectados con Mh usando temperaturas fluctuantes (18,3-21ºC) y amoníaco como agentes estresantes.

Por otra parte, cuando Straw (1991) comparó animales con condiciones ambientales óptimas y desfavorables, observó una mayor ganancia (765 gr *vs* 639 gr) y conversión (3,31 *vs* 4,41) en las primeras. Sorprendentemente, no hubo diferencias en cuanto a las lesiones neumónicas al sacrificio. Debe señalarse, que la mayor diferencia en este trabajo fue el espacio por cerdo (1,11 m2/cerdo *vs* 0,52 m2/cerdo) y el número de cerdos por corral (5 *vs* 25) sugiriendo que estos factores podrían haber sido los responsables de las diferencias en la producción.

Los parámetros climáticos que se evalúan en los diferentes trabajos, no tienen un efecto *"per se",* sino que son consecuencia del manejo. Así, la ventilación está asociada con los gases y éstos con la higiene, al igual que la humedad y el polvo y el microbismo. Un aumento en el flujo de aire no controlado provoca una disminución en la temperatura, humedad y gases (mayor en CO_2 que en amoníaco) e indica una elevación de polvillo-endotoxinas. Este ambiente seco favorece, a su vez, que el polvo se quede suspendido en el aire (Noyes y cols., 1986; Noyes y cols., 1988; Donham, 1991; Pijoan, 1994).

Un estudio reciente, demuestra que las precipitaciones y la temperatura pueden tener un impacto significativo en la dinámica de la infección por Mh (Segalés y cols., 2012). En esta investigación, se demostró una asociación significativa (positiva) entre las precipitaciones semanales y la probabilidad de detectar Mh mediante mester-PCR y una asociación también significativa (negativa) entre las temperaturas semanales y el porcentaje de animales seropositivos.

Otros factores predisponentes que influyen en la incidencia de la enfermedad, son todas aquellas situaciones de estrés, tales como el sistema de producción, momento del parto, destete, deficiencias nutricionales en el crecimiento y acabado, así como todas aquellas que puedan provocar una disminución o agotamiento de las defensas del animal.

2.4.1.3 PATOGENIA

Mh es un patógeno específico del hospedador que solo afecta al cerdo, la patogenia y especialmente los posibles factores de virulencia aún no se conocen totalmente (Simionatto y cols., 2013).

El desarrollo o no de la enfermedad dependerá, en primer lugar, del micoplasma implicado y en segundo lugar, de la especie animal afectada así como del estado del animal en el momento de la exposición.

- Factores dependientes de los micoplasmas:

    - Exposición.
    - Unión o adhesión de los micoplasmas a la superficie epitelial.
    - Producción de toxinas.

- Factores dependientes del hospedador.

    - Interacción con el sistema defensivo primario (macrófagos y neutrófilos) y con el sistema inmune (celular y humoral) del hospedador.
    - Inducción de factores que esquivan la respuesta del organismo como son la síntesis de cápsulas, la inmunosupresión y la producción o adquisición de Ags del hospedador.
    - Inducción de una respuesta inmune específica.

Según Gourlay y Howard (1982), la patogenia de las micoplasmosis respiratorias se puede dividir en las siguientes etapas y este modelo se ha tomado para desarrollar la patogenia de Mh en la NEP.

El punto central sobre el que se orienta la mayoría de los estudios de patogenia es la interacción entre el micoplasma y la membrana citoplasmática de las células epiteliales de las vías respiratorias. Mh es un microorganismo extracelular cuya presencia sobre la mucosa del aparato respiratorio disminuye en el curso de la enfermedad, llegando prácticamente a desaparecer en las fases más avanzadas de la misma (Kobisch y Friis, 1996).

Mh puede infectar a los animales por la inhalación de aerosoles contaminados que se producen durante los golpes de tos de otros animales infectados por Mh (Thacker y Minion, 2012). La infección se origina normalmente cuando los lechones que poseen Acs maternales son trasladados a las naves de engorde después del destete. Así, los lechones pasan inicialmente protegidos a estas naves, pero al perderlos quedan expuestos a estos aerosoles. Una vez que estos cerdos susceptibles se infectan con Mh, éste se adhiere al epitelio ciliado de las vías respiratorias. Con el tiempo, el agente causal se multiplica y avanza por el árbol bronquial. El grado de adhesión de Mh al epitelio respiratorio determina la patogenicidad de las diferentes cepas. La adhesión del micoplasma a los cilios de las células epiteliales provoca, por un lado, su pérdida, y por otro un efecto citopático sobre la célula lo que algunos autores atribuyen, no sólo a la capacidad de adhesión, sino también a una competencia metabólica entre el agente patógeno y la célula epitelial. La degeneración y necrosis celular consiguiente y su descamación provocan, como respuesta, una hiperplasia epitelial que intenta reparar la pérdida de las células (Kobisch y Friis, 1996). Se han descrito varios modelos *in vitro* para hacer posible el estudio de la colonización del epitelio del tracto respiratorio porcino (Jacques y cols., 1992; Zielinski y Ross, 1992; Zielinski y Ross, 1993; DeBey y Ross, 1994; Zhang y cols., 1995; Young y cols., 2000).

La adhesión del microorganismo al epitelio respiratorio, la estimulación de una respuesta inflamatoria prolongada, la supresión y modulación de una respuesta innata y adaptativa son pasos muy importantes en la colonización e infección de este patógeno (Thacker y Minion, 2012).

En la adhesión del micoplasma a las células epiteliales ciliadas juegan un papel importante el material capsular y las fibrillas del micoplasma. La importancia de esta interacción micoplasma-célula es tal que una de las medidas preventivas que se pretenden alcanzar en el futuro es impedir, de algún modo, esa unión entre la membrana celular y la del micoplasma. El método exacto de adhesión de Mh a los cilios aún no se conoce totalmente. Se han descrito un elevado número de adhesinas expresadas en caldos de cultivos y en estudios *in vivo* en cerdos infectados experimentalmente (Simionatto y cols., 2013).

La pérdida de los cilios del epitelio respiratorio compromete el sistema mucociliar, lo que favorece las infecciones secundarias por otros agentes infecciosos que no sólo agravan el cuadro neumónico, sino que incluso puede originar la muerte de los animales afectados.

Se ha demostrado que Mh tiene un efecto modulador de la respuesta inmune, si bien no se conoce muy bien el efecto de esta modulación. Algunos autores sugieren que la respuesta inmune juega un papel importante en el desarrollo de las lesiones. Describen que los PAMs y linfocitos, estimulados por Mh, producen citoquinas proinflamatorias que son las responsables de las lesiones pulmonares y de la de hiperplasia del BALT (Rodríguez y cols., 2004).

A medida que progresa la infección, aumenta la severidad de las lesiones y comienzan a aparecer los síntomas de la enfermedad. El tipo de consolidación pulmonar observado en la NEP refleja una distribución broncogénica que compromete la limpieza mucociliar. En realidad, la NEP es una neumonía broncointersticial, es decir, una bronconeumonía de características exudativa intersticial. Estas bronconeumonías exudativas se originan por infecciones que se producen por vías aéreas, y por lo tanto se inician con un cuadro bronconeumónico (afectación de lóbulos craneales) que dura apenas 24 a 48 horas, para transformarse rapidamente en neumonías intersticiales (o proliferativas). Los micoplasmas son, junto con algunos virus, los únicos agentes etiológicos que producen este tipo de neumonías broncointersticiales (Maes y cols., 1996).

La hiperplasia del BALT que caracteriza lesionalmente a esta enfermedad, es atribuida a la conjunción de varios procesos. Por un lado, existe una respuesta celular inmune específica frente al Mh. Por otro, la membrana del Mh actúa como un mitógeno inespecífico para los linfocitos porcinos, sin que induzca una respuesta inmune específica frente a este agente patógeno. El significado biológico de este efecto mitogénico no ha sido aclarado. La necrosis de las células epiteliales también participa en la inducción de la hiperplasia del tejido linfoide. La estimulación de los linfocitos está acompañada de un "tráfico local" de estas células entre el pulmón y los ganglios mediastínicos, lo que explicaría la proliferación de tejido linfoide en estos ganglios, en los que no se detectan micoplasmas (Kobisch y Friis, 1996).

Si bien, Mh es un patógeno primario de vías respiratorias, algunos estudios han descrito su aislamiento en otros órganos internos, sugiriendo una posible propagación del patógeno vía linfática o sanguínea. Éste ha sido aislado y se ha detectado su ADN en hígado, bazo y riñón de animales infectados experimentalmente y por contacto, sin embargo no se han visto involucrados en el desarrollo de la NEP (Marois y cols., 2007; Woolley y cols., 2012).

2.4.1.4 CLÍNICA

La NEP tiene un periodo de incubación de 10 a 15 días. Sin embargo, el tiempo desde la primera entrada del microorganismo a una explotación hasta la primera presentación de los signos clínicos es muy variable. Es de destacar que, a pesar de ser detectado Mh en lechones de dos semanas de vida, las primeras manifestaciones clínicas se observan a partir de las cuatro semanas de edad, cuando los cerdos entran en las unidades de crecimiento-acabado y han perdido la protección materna (Kobisch y Friis, 1996).

En condiciones naturales, la NEP es una enfermedad crónica que cursa con alta morbilidad y baja mortalidad. Las categorías más afectadas son los cerdos en etapa de crecimiento y engorde, dependiendo del estado inmune del animal y del manejo. En sistemas de producción todo dentro/todo fuera los síntomas pueden retrasarse hasta las 12-20 semanas de edad y afecta principalmente a animales de cebo en régimen de producción intensiva (Maes y cols., 1996).

Los signos clínicos de la NEP son variables según la fase evolutiva de la enfermedad, pero siempre se observan en un grupo de animales y no de forma individual, la intensidad se exacerba por condiciones de estrés y/o por infecciones secundarias, pudiendo llegar estas complicaciones a originar la muerte de los animales afectados (Sorensen y cols., 1997).

Los primeros signos clínicos que se observan en infecciones naturales son anorexia, respiración con soplo, hipertermia moderada e inapetencia, aunque en algunos casos la tos es posiblemente el único signo apreciable en las primeras fases de la enfermedad. Su aparición es lenta, comienza a partir de los 6 días postinfección, con un pico a los 27 días y prácticamente desaparece a los dos meses (Cowan y van Buren, 1986; Sorensen y cols., 1997).

En otros casos, la tos aparece en la fase crónica de la enfermedad y se hace entonces persistente. Se trata de una tos seca e improductiva, puede estar acompañada por estornudos aunque los movimientos respiratorios sean normales. Para identificar a los animales con toses es importante observarlos durante un largo periodo de tiempo y resulta especialmente característica cuando se mueven los animales tras un período de reposo.

La cuantificación del número de cerdos con toses ha sido utilizado en diferentes protocolos clínicos, pudiendo alcanzar hasta un 30 y 70% de los animales sometidos a estudios, tales como:

- Estudios de transmisión (Meyns y cols., 2006; Marois y cols., 2007).
- Estudios de patogenia (Morris y cols., 1995a; Vicca y cols., 2003).
- Estudios de eficacia de las vacunas frente a Mh en condiciones de campo (Maes y cols., 1996; Moreau y cols., 2004).
- Estudios con inoculaciones experimentales (Thacker y cols., 2000).

Según evoluciona a su forma crónica los signos van desapareciendo, primero la hipertemia y en algunos casos la tos, observándose signos de retraso en el crecimiento, pelaje hirsuto y opaco con disminución de los índices de conversión alimenticia, pudiendo éstos ser los únicos indicadores de presencia de NEP (Dungworth, 1993).

La NEP se puede encontrar asociada a bacterias y/o virus que modifican la sintomatología. En estos casos, la tos es continua e intensa y puede estar acompañada de estornudos y descarga nasal, la respiración es forzada y jadeante, y los movimientos respiratorios son dificultosos. Los animales presentan decaimiento y fiebre alta, y hasta un 10% de los animales afectados pueden morir, particularmente cuando no se instaura el tratamiento adecuado (Amass y cols., 1994).

Otros signos clínicos relacionados con la infección de Mh son poco frecuentes, aunque algunos trabajos hacen referencia, en inoculaciones con cepas de campo, a artritis, cojera y lesiones serofibrinosas relacionados con la virulencia de las cepas utilizadas (Lloyd y cols., 1989; Kobisch y Friis, 1996).

2.4.1.5 LESIONES MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS

- ✓ ***Lesiones Macroscópicas.***

Las lesiones de la NEP varían al igual que los signos clínicos según la fase de la enfermedad y las posibles complicaciones secundarias en el momento de la inspección.

Los cerdos desarrollan lesiones pulmonares evidentes a partir de los 7 a los 10 días después de la infección. En las fases iniciales (14 a 28 dpi) las lesiones más características están constituidas por áreas de consolidación de color rojo-violáceo del parénquima, de consistencia firme, carnosa y húmeda a la palpación, localizadas en los lóbulos craneales, medios, intermedio y porción craneal de los caudales, pudiendo estar delimitado del tejido pulmonar normal por áreas enfisematosas (Strasser y cols., 1992; Sorensen y cols., 1997). Al corte se puede observar un exudado catarro-purulento en la luz de los bronquios. Según evolucione la lesión, con o sin complicaciones secundarias bacterianas y/o virales el patrón macroscópico puede variar (Lium y Falk, 1991; Dungworth, 1993).

En su forma crónica, el color varía a grisáceo, observándose además nódulos blanquecinos debidos a la hiperplasia del BALT en el centro de los lobulillos atelectásicos, acompañados de estrías blanquecinas dentro de las zonas afectadas. Según Strasser y cols. (1992) y Sorensen y cols. (1997), el porcentaje de lesión por lóbulo disminuye hacia el día 57 pi, afectando únicamente a los lóbulos medios, apareciendo completamente resueltas el día 85 pi.

Como ya se comentó en el PRDC, dependiendo de la bacteria con la cual esté complicada, se puede observar una bronconeumonía supurativa, áreas de necrosis, formación de abscesos, pleuritis serofibrinosa o fibrinosa, que tienden a formar adherencias entre lóbulos pulmonares y la pared costal. En casos de complicaciones virales podemos encontrar lesiones de tipo predominantemente intersticial, pudiendo enmascarar parte del patrón típico de la NEP (Lium y Falk, 1991; Wallgren y cols., 1994).

Los linfonodos mediastínicos se encuentran aumentados de tamaño, relacionándose directamente el tamaño con la extensión de las lesiones neumónicas (Lium y Falk, 1991).

El pulmón derecho resulta siempre más afectado que el izquierdo al poseer una distribución broncogénica más abundante (bronquio traqueal). Maes (1996) y Sorensen y cols. (1997), observaron una mayor prevalencia de las lesiones en los lóbulos craneal derecho, medio derecho y medio izquierdo y sobre el día 28 pi las lesiones en estos tres lóbulos fue del 96%, 98% y 98%, respectivamente.En otro estudio realizado por Andrada (2001), se determinó el porcentaje de lesión pulmonar compatible con NEP en pulmones inspeccionados en Argentina y España. El 55% de los pulmones inspeccionados en

Argentina presentaron algún grado de lesión compatible con NEP; con un 4,7% del volumen pulmonar total comprometido y presentando mayor afección el pulmón derecho (3%) que el izquierdo. Del mismo modo, en España, el 54% de los pulmones inspeccionados presentó lesiones compatible con NEP, estando igualmente el pulmón derecho (5,5%) más afectado que el izquierdo (2,3%).

- ✓ ***Lesiones Microscópicas.***

En las fases iniciales de la enfermedad (primera semana pi) se presenta pérdida de cilios y exfoliación de células ciliadas en las vías aéreas e hiperplasia de las células caliciformes en bronquios y bronquiolos y glándulas submucosas. Este incremento de las células secretoras es el responsable de la presencia de exudado catarral en las vías aéreas. Ackermann y cols. (1991), describieron cambios del epitelio bronquiolar de cúbico a pseudoestratificado (metaplasia epitelial), utilizando marcadores para lectinas sobre animales infectados experimentalmente. Las tráqueas de animales infectados mostraron una ligera traqueítis, constituida por hiperplasia epitelial e infiltrado de células linfoplasmocitarias en la lámina propia.

En el parénquima pulmonar, en esta primera fase, se observa una bronconeumonía catarral, con edema alveolar y pequeños acúmulos de neutrófilos y macrófagos en vías respiratorias y en alvéolos. El infiltrado de neutrófilos es sustituido por linfocitos y, a partir de los 15-20 días de la infección se observan acúmulos de células mononucleares engrosando los septos interalveolares, momento en el que el patrón histológico va definiendo una neumonía broncointersticial con hiperplasia perivascular y peribronquial del BALT. Estos últimos, se corresponden con los nódulos blanquecinos descritos en las lesiones macroscópicas (Sorensen y cols., 1997).

En el proceso evolutivo de la lesión hacia su forma crónica, las lesiones microscópicas se manifiestan por una extensa proliferación del BALT, engrosamiento de los septos con infiltrado celular constituido por linfocitos y células plasmáticas, pudiendo proliferar el tejido conectivo que determinará la fibrosis pulmonar de la zona afectada. Además, la pared de los alvéolos se encuentra tapizada por células cúbicas (neumocitos tipo II) que han sustituido a los neumocitos tipo I (Dungworth, 1993).

La hiperplasia del BALT, sin duda es la lesión más característica de la NEP (Nogueira y cols., 1980), y puede llegar a afectar la pared bronquial, infiltrando hasta la muscular de la mucosa del bronquio, con la consiguiente oclusión parcial de su luz. Livingston y cols. (1972), propusieron la siguiente clasificación semi-cuantitativa de las lesiones observadas en los pulmones de cerdos al sacrificio:

> ***Lesiones (+):*** Presencia de infiltrado inflamatorio peribronquial formando uno o más folículos linfoides a nivel de la submucosa pero sin penetrar en la capa muscular de la mucosa.
> ***Lesiones (++):*** Uno o más folículos linfoides que se extienden a través de la muscular de la mucosa, y escaso infiltrado inflamatorio, tanto a nivel septal como en luces bronquiales y alveolares (leucocitos polimorfonucleares neutrófilos). La pared alveolar está, por lo general, poco engrosada.
> ***Lesiones (+++):*** Hiperplasia linfoide perivascular y peribronquiolar con numerosas células septales y leucocitos polimorfonucleares neutrófilos en las luces alveolares. En las áreas afectadas, el bronquio contiene, generalmente, un gran número de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos en la luz.
> ***Lesiones (++++):*** Hiperplasia linfoide perivascular y peribronquiolar masivas en áreas extensas del parénquima pulmonar. El infiltrado septal e intraluminal (macrófagos, leucocitos polimorfonucleares neutrófilos) es escaso y se puede encontrar edema alveolar en las áreas afectadas.

Otros autores proponen graduaciones similares describiendo como **(0)** la ausencia de lesión; **(+)** la presencia de moderado infiltrado inflamatorio difuso de linfocitos a nivel peribronquial, peribronquiolar y perivascular, incluyendo la lámina propia; **(++)** moderado incremento del infiltrado de linfocitos y/o la presencia de algunos folículos linfoides; **(+++)** marcado número de folículos linfoides y **(++++)** extenso número de folículos linfoides afectando a más de una sección del pulmón (Ross, 1999).

2.4.1.6 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de las infecciones por micoplasmas pueden abordarse desde varios puntos de vista (Sibila y cols., 2009), incluyendo signos clínicos, inspección en matadero de los pulmones afectados y estudios serológicos de grupos de animales representativos (Fraile y cols., 2010; Meyns y cols., 2011), identificación directa del patógeno mediante cultivo bacteriológico (Marois y cols., 2007) o técnicas de PCR (Calsamiglia y cols., 1999; Marois y cols., 2010). Se han empleado numerosos tipos de muestras, incluidos hisopos nasales (Calsamiglia y Pijoan, 2000; Fano y cols., 2007; Villarreal y cols., 2010), raspados tonsilares (Fablet y cols., 2010) y lavados traqueobronquiales (Meyns y cols., 2004, 2006; Fablet y cols., 2010; Vranckx y cols., 2012). Recientemente se han desarrollado y validado el uso de hisopos traqueobronquiales (Fablet y cols., 2010).

El principal signo clínico de NEP es la presencia de tos, que evoluciona de forma gradual desde la etapa de crecimiento hasta hacerse crónica en animales en la etapa de terminación. El diagnóstico clínico de la enfermedad se realiza cuando se observan en el grupo completo de animales y no de forma individual, sabiendo que es una enfermedad de presentación enzoótica asociada a las condiciones ambientales de la explotación. Existen co-infecciones con otros patógenos como *Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Arcanobacterium pyogenes* que inducen otros síntomas como fiebre, anorexia y dificultad respiratoria (Thacker, 2006).

Tal y como se ha explicado en apartados anteriores, Mh está íntimamente involucrado en la patogénesis del PRDC, enfermedad que incluye a las bacterias citadas anteriormente, así como a virus tales como: PRRSv, PCV2, el virus de la enfermedad de Aujeszky, SIv y el PRCv. EL PRDC afecta a cerdos en terminación entre las 14 a 22 semanas de edad y se caracteriza por disminución en la tasa de crecimiento, conversión alimenticia, fiebre, tos y disnea (Dee, 1996). Por lo expuesto, se pone en evidencia la necesidad de utilizar diferentes técnicas de diagnóstico, para la obtención de una mayor información en los diferentes campos de estudio de la enfermedad.

- ✓ ***Valoración en Matadero***

Durante muchos años, se han seguido una serie de criterios para valorar adecuadamente la cantidad de parénquima pulmonar comprometido en los procesos neumónicos en inspecciones en matadero (Tabla 4).

Aún así, en varios países con o sin planes de vacunación, se emplea este método como herramienta para evaluar y correlacionar el porcentaje de compromiso pulmonar con los índices productivos de las explotaciones, así como la estimación de las respectivas prevalencias para las diferentes enfermedades respiratorias.

Con estos precedentes, no existe un método universal para la evaluación de la cantidad de pulmón que se encuentra afectado por la NEP; además, resulta difícil establecer una relación entre la extensión de las lesiones neumónicas y los parámetros de producción.

Goodwin (1976), describe un protocolo de puntuación en el que las lesiones pulmonares se clasificaron asignándole una puntuación a cada lóbulo con parénquima afectado. Así, se puede obtener una puntuación que va desde 0 a 55 puntos, siendo este último valor, el máximo porcentaje de parénquima afectado en la neumonía enzoótica: Ninguno, 0; grado medio, 1-10; grado moderado, 11-30; grado severo, 31-55.

Otro método de puntuación muy difundido es el publicado por Morrison y cols., (1985), en el que los lóbulos craneal derecho, medio derecho, caudal derecho, intermedio o accesorio, craneal izquierdo, medio izquierdo, y caudal izquierdo ocupan el 11,9; 7,5; 30; 4,5; 7,1; 6,9 y 31,6% respectivamente, en el pulmón neumónico.

Otro criterio utilizado por Jericho y cols. (1975), se basa en la consolidación del parénquima. Así, puntúa los pulmones en cuatro categorías: sin consolidación, del 0 al 5% de consolidación, del 5 al 10% y más del 10% de consolidación. Por otra parte, se evaluó la extensión de las neumonías basándose en una escala de seis puntos, siendo el 0 indicativo de la no existencia de lesiones macroscópicas y el 6 de lesiones muy severas.

Un método similar descrito por Straw y cols. (1986), cuantifica para cada lóbulo caudal el valor del 25% del total del pulmón y cada uno de los lóbulos restantes representa el 10%. Estos autores consideran que por cada 10% de pulmón afectado de NEP se produce con una disminución del 3,3 al 5,3% en el promedio de ganancia diario de peso.

Según Goodwin (1965), se podría tener un indicador del grado de neumonía calculando el predominio de pulmones afectados en el momento del sacrificio. Una explotación con el 30% de pulmones neumónicos estaría ligeramente afectada, con un 40-50% estaría afectada, del 50 al 70% sería moderado, del 70 al 85% severo y más del 85% muy severo.

En relación a los diferentes patrones morfológicos y su distribución, Buttenschon (1989), propuso cinco patrones de neumonías en porcino: bronconeumonías, pleuroneumonías, bronconeumonías diseminadas secundariamente, neumonías verminosas y neumonías por diseminación hematógena.

En el caso de las pleuritis, éstas han sido valoradas por Christensen (1998), teniendo en cuenta la adherencia de la pleura parietal y visceral, la adherencia entre los lóbulos pulmonares y la pleuritis sobre la superficie lobular sin adherencias. Cada presentación se evaluó independientemente para luego aplicar una transformación logarítmica, y obtener una escala unificada considerándose también los procesos agudos y/o en fase de resolución.

Algunos autores han utilizado inoculaciones experimentales con Mh, aplicando una escala del 0 al 4 para cuantificar el parénquima pulmonar comprometido, correlacionándolo además con parámetros productivos, encontrándose diferencias en los resultados medidos tanto en inoculaciones experimentales como en infecciones naturales (Zimmermann y Ross, 1982).

Tabla 4: Resumen de los distintos criterios de puntuación de las lesiones macroscópicas empleados en la valoración en matadero. *(D, derecho; I, izquierdo)*

Referencia	Puntuación	Factor de corrección: relativo al peso de cada lóbulo							Punt. máx.
		Apical		Medio		Diafrag		Accesorio	
		D	I	D	I	D	I		
Jericho y cols., 1975	Consolidación del parénquima. Extensión 0-6 puntos.	Sin consolidación; 0-5% de consolidación, 5-10% de consolidación; >10% de consolidación. No existencia de lesiones: 0; presencia de lesiones muy severas: 6.							55
Goodwin, 1976	0-55 puntos. Lóbulos con parénquima afectado	Ninguno: 0; grado medio: 1-10; grado moderado: 11-30; grado severo: 31-55							
Hannan y cols., 1982	1-5 puntos por lóbulo	5/7	5/7	5/7	5/7	5/19	5/19	5/8	35
Madec y Kobisch, 1982	1-4 puntos por lóbulo dependiendo del porcentaje de lóbulo afectado	Sin lesión: 0; <25% de lóbulo afectado: 1; 25-49% de lóbulo afectado: 2; 50-74% de lóbulo afectado: 3; >75% de lóbulo afectado: 4 puntos.							28
Morrison y cols., 1985	Porcentaje de lóbulo afectado	11,9	7,1	7,5	6,9	30	31,6	4,5	100
Straw y cols., 1983, 1984, 1986	Porcentaje de lóbulo afectado. Factor de corrección.	10	10	10	10	25	25	10	100
Christensen y cols., 1999	Porcentaje de lóbulo afectado	7	4	15	9	35	25	5	100
Patrón morfológico y su distribución:									
Buttenschon 1989	5 patrones de Neumonías	Bronconeumonías; pleuroneumonías; bronconeumonías diseminadas secundariamente; neumonías verminosas; neumonías por diseminación hematógena.							
Pleuritis:									
Christensen, 1998	Adherencia de la pleura parietal y visceral; adherencia entre lóbulos pulmonares y pleuritis sobre la superficie lobular sin adherencia.								
Explotación:									
Goodwin, 1965	Porcentaje de pulmones afectados en Sacrificio	Ligeramente afectada: <30%; afectada: 30-50%; moderadamente afectada: 50-70%; Severamente afectada: 70-85%; muy severamente afectada: >85%.							100

Para contrastar las diferencias entre extensión de lesión, patrones morfológicos y parámetros productivos, Morrison y cols., (1986), propuso obtener datos individuales de producción para cada uno de los animales, evaluar cada pulmón y cada uno de sus lóbulos; siempre con un mismo operario.

Los resultados procedentes de la inspección macroscópica, según el uso de distintos métodos y su ambigua correlación con los parámetros productivos, podría además estar influenciado por el momento y período del año en el que se hace la inspección: la estacionalidad. Así, por ejemplo, Morrison y cols. (1986), citan que existe una mayor incidencia de NEP al sacrificio en Inglaterra durante las inspecciones realizadas en primavera y primavera-verano.

En Argentina, estudios realizados en sistemas al aire libre determinaron la prevalencia estacional de patologías respiratorias, observándose que las neumonías compatibles con NEP presentaron un incremento sostenido durante el período de mayo, junio, julio, noviembre, diciembre y enero. Estos datos indicarían una mayor incidencia de la enfermedad en los meses de otoño a invierno, verificándose en matadero en los meses de primavera-verano (Riart y cols., 1996).

- ✓ ***Diagnóstico laboratorial.***

El diagnóstico laboratorial y definitivo de la NEP se establece mediante el aislamiento e identificación de Mh, y/o en la identificación del agente en tejidos, así como la identificación de porciones específicas de su genoma mediante el uso de diferentes técnicas; técnicas que se denominan métodos directos. Por el contrario, las que intentan demostrar Acs específicos anti-micoplasmas, constituyen los métodos indirectos. La decisión de qué técnica debe utilizarse se establece a partir de los datos epizootiológicos y/o anatomopatológicos.

Mh es uno de los micoplasmas más difíciles de cultivar, por ser extraordinariamente exigente en cuanto a sus requerimientos de crecimiento y, además, porque *Mycoplasma hyorhinis*, otro micoplasma que se encuentra habitualmente en el tracto respiratorio de los cerdos, crece más rápidamente que él.

Para la identificación de Ags de Mh se pueden emplear técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) que combinan métodos anatomopatológicos, inmunológicos y bioquímicos, con el objetivo de localizar componentes del microorganismo en tejidos infectados, mediante el empleo de Acs específicos y moléculas marcadoras. Igualmente, permite caracterizar poblaciones celulares que participan en la respuesta celular y humoral en distintas patologías respiratorias porcinas (Fernández y cols., 1989; Haines DM, 1993; Perfumo y cols., 1993; Halbur y cols., 1994; Perez y cols., 1994; Segales y cols., 1997a; Segales y cols., 1997b; Halburg, 1998; Kiupel y cols., 1998) .

Los protocolos han ido evolucionando en función de los avances de nuevos productos, especialmente con el desarrollo e incorporación de los Acs monoclonales que le confieren una mayor especificidad (Quezada y cols., 1990; Quezada y cols., 1993; Liu y cols., 1998) . Conjuntamente la realización de la técnica utilizando el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABP), ofrece grandes ventajas al aumentar notablemente la sensibilidad de la técnica, pudiendo ser de 20 a 40 veces más que la técnica PAP (Peroxidasa anti-peroxidasa).

La primera demostración de Ags bacterianos en cortes por congelación la realizo Bruggmann y cols., (1977), Giger y cols., (1977), y sus resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad fueron similares a los obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia.

Posteriormente, Doster y Chang Lin (1988) utilizaron Acs policlonales y la técnica de IPMA indirecta en tejido pulmonar infectado natural y experimentalmente, fijado e incluido en parafina. Los microorganismos identificados en los cortes fueron estructuras pleomórficas de 0,3 a 0,5 μm de diámetro, localizados en la superficie del epitelio respiratorio de bronquios y bronquiolos, en el citoplasma de macrófagos y en la luz de bronquios y bronquiolos.

La IHQ permite al patólogo correlacionar la presencia de Ags de micoplasmas con las lesiones de NEP, mediante el empleo de Acs monoclonales y policlonales en muestras fijadas en formaldehídos e incluidas en parafina (Sarradell y cols., 2003; Rodríguez, 2004). La IFA directa (Kobisch y cols., 1978) e indirecta (Piffer y Ross, 1985) se han usado para la localización de Ags de Mh en pulmones de cerdo. Los resultados obtenidos mediante IFA han sido comparados con los obtenidos por PCR en muchos estudios de patogenia y transmisión (Sorensen y cols., 1997; Vicca y cols., 2003; Meyns y cols., 2006). Una IFA positiva se asocia a una fase aguda de la enfermedad, cuando la carga bacteriana es elevada, en comparación con la baja sensibilidad que muestra esta técnica en las fases más crónicas de la enfermedad, donde la carga de *Mycoplasma* es baja (Ross, 1999).

Aunque la IHQ y la IFA son técnicas específicas para la detección de Mh en cortes de tejido pulmonar, tiene la desventaja de que se realizan postmortem. Además, se emplean muestras pequeñas de pulmón, de manera que se puede incrementar en gran medida los falsos-negativos si no se ha tomado tejido pulmonar donde del lugar en donde se encuentre Mh (Cai y cols., 2007). Por otro lado, la sensibilidad también se puede ver afectada si no se procesan las muestras de forma adecuada. La calidad de los Acs empleados puede limitar la especificidad de estos métodos, ya que en el caso de los Acs policlonales pueden aparecer reacciones cruzadas con otras especies de *Mycoplasma* (Cheikh y cols., 2003).

La hibridación in situ (ISH) es una técnica de detección molecular que permite localizar de forma específica utilizando una sonda marcada con digoxigenina específica para una secuencia del genoma de Mh en muestras de pulmón fijado con formaldehido e incluido en parafina, utilizándose como método para el diagnóstico NEP (Stemke, 1989; Ahrens y Friis, 1991; Ahrens, 1996).

Kwon y Chae (1999) detectaron Mh utilizando la hibridación *"in situ"* con una sonda (520 pares de bases) unida a digoxigenina sobre 20 pulmones infectados en condiciones de campo, observándose fuertes signos de hibridación en la superficie de las células epiteliales de bronquios y bronquiolos. No se observaron signos de hibridación en BALT y sólo en menor grado en los macrófagos intersticiales alveolares y los neumocitos tipo I. También se ha usado en pulmones infectados de forma experimental (Kwon y cols., 2002).

Varios autores describen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como técnica para la detección de Mh en una amplia variedad de muestras, como pulmón, fluidos de lavados broncoalveolares o hisopos nasales (Baumeister y cols., 1998; Calsamiglia y cols, 1998; Otagiri y cols., 2005; Pieters y cols., 2006). Mattsson y cols. (1995), diseñaron un pool de "primers" para la amplificación de un fragmento de 649 pb del gen rARN de Mh para evaluar muestras de hisopos nasales, lavados bronquiales y en tejidos de pulmón de animales infectados experimentalmente. Cuando se chequearon hisopos nasales procedentes de animales de cebo, Mh se detectó en un período limitado de tiempo durante la infección.

Posteriormente, Blanchard y cols. (1996), analizaron lavados traqueobronquiales procedentes también de animales infectados experimentalmente con el "primer" I 141, pudiendo detectar las diferentes cepas de Mh utilizadas en el estudio. Resultados similares en lavados traqueobronquiales de animales inoculados experimentalmente, así como de casos naturales, utilizando otro "primer" de 853 pb fueron descritos por Baumeister y cols. (1998).

Stärk y cols. (1998), detectaron Mh en muestras de aire aplicando una “nested-PCR” bajo condiciones experimentales y naturales. La “nested-PCR” es una técnica con mayor sensibilidad que la convencional que permite amplificar un segmento específico de muy pequeño tamaño incluido dentro de fragmentos de ADN más extensos. Calsamiglia y cols. (1998), estudiaron comparativamente la detección de Mh en hisopos nasales utilizando la técnica de "nested-PCR" y la PCR convencional y observaron una mayor sensibilidad en la nested PCR. En otro estudio, la aplicaron para valorar la diseminación de Mh en reproductoras vacunadas y no vacunadas de diferentes partos.

Debido a las limitaciones de las técnicas directas, se dispone de técnicas indirectas que permiten realizar los diagnósticos en un gran número de animales (Quezada y cols., 1993). Técnicas como el ELISA, la fijación del complemento (FC), HAI, nos permiten conocer el estado sanitario de la explotación (Pijoan, 1994; Morris y cols., 1995; León y cols., 2001; Grosse-Beilage y cols., 2009; Thacker, 2010). Las serologías mediante ELISA pueden ser transversales o seroperfil. Resulta por tanto evidente, que el conocer parámetros como la protección del individuo por inmunidad maternal o sobre una fase de infección, así como el tiempo que tarda en producirse la seroconversión nos permitirá diseñar una estrategia de control y prevención de la enfermedad para cada explotación. Se han comparado el FC con el ELISA, demostrándose que éste es más preciso que la FC en la detección de Acs de Mh (Piffer y Ross, 1984; Bereiter y cols., 1990; Okada y cols., 2005). Actualmente el ELISA es el método más usado. Sin embargo, no es el más adecuado para determinar infecciones recientes (Thacker y Minion, 2012).

La seroconversión en condiciones naturales es más lenta que en estudios experimentales. Autores como Sheldrake y cols. (1990) y Kobisch y cols. (1993), detectaron Acs frente a Mh a las 2-4 semanas post-infección intratraqueal en cerdos, mientras que Sorensen y cols. (1997) reportaron una seroconversión próxima a los 8 dpi en algunos animales inoculados por aerosol, aunque en el resto de los animales de la experiencia la seroconversión se produjo pasadas las 5 semanas. En condiciones naturales, Morris y cols. (1995b), observaron la seroconversión hacia las 3 semanas post-infección, llegando hasta las 11 semanas. En otros dos trabajos realizados en condiciones de campo, la seroconversión ocurrió en animales con edades comprendidas entre las 8 y 24 semanas de edad, presentándose entre las 6-9 semanas post-infección (Andreasen y cols., 2000; Leon y cols., 2001). Este retraso en la seroconversión asociada a Mh puede deberse al hecho de que este patógeno se adhiere al epitelio ciliado respiratorio y no llega a invadir el tejido pulmonar, lo que conlleva una presentación tardía de los Ags de Mh al hospedador, de ahí que no exista una correlación entre los títulos de Acs y la protección frente a la infección (Maes y cols., 1996).

Los test ELISA que se emplean con mayor frecuencia para la detección de Acs de Mh son el ELISA de competición (IDEI, *Mycoplasma hyopneumoniae* IEA kit, Oxoid) y dos test ELISA indirectos (HerdCheck, IDEXX y Tween 20-ELISA). Según algunos estudios comparativos, existen diferencias significativas en la sensibilidad y especificidad de estos test (Pijoan, 1994; Strait y cols., 2004; Erlandson y cols., 2005; Ameri y cols., 2006). Cuando existen estas discrepancias entre las técnicas serológicas empleadas, se puede realizar un Western blot immunoassay (WBI) para confirmar el diagnóstico (Ameri y cols., 2006).

2.4.2 VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO

2.4.2.1 ETIOLOGÍA

El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSv) es un virus con envoltura, N en sentido positivo, con un diámetro aproximado de 50-65 nm, clasificado en el Orden *Nidovirales*, Familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus* junto con Arterivirus equino, el virus elevador de la lactato-deshidrogenasa en ratones y el virus de la fiebre hemorrágica en simios (Benfield y cols., 1992; Cavanagh, 1997).

Este virus se establece como agente etiológico de un síndrome (Meredith, 1995; Morrison, 1992) que, desde 1987, ha recibido numerosos nombres. Entre ellos destaca la "enfermedad porcina misteriosa", la "enfermedad azul porcina" (*Blue ear disease*), "síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo" (*Swine Reproductive and Respiratory Syndrome*, SRRS), "síndrome respiratorio y de infertilidad porcino" (*Swine Infertility and Respiratory Syndrome,* SIRS), "síndrome respiratorio y aborto epidémico porcino" (*Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome*, PEARS), y finalmente el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*, PRRS) (Goyal, 1993). Fue en el 1º Symposium Internacional sobre SIRS/PRRS, celebrado en St. Paul, Minnesota, USA, en 1992, donde se decide ponerle este último nombre, y al virus que lo produce, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus*, PRRSv)

Este síndrome es endémico en la población porcina mundial y continúa siendo una de las principales causas de pérdidas reproductivas y problemas respiratorios en esta especie (Keffaber, 1989; Meredith, 1995; Plagemann, 1996).

En cuanto a la diversidad genética, existen dos grandes grupos de PRRSV, la cepa Europea (Lelystad virus) y la cepa Norteamericana (VR-2332). Además de las diferencias entre ambas, se ha determinado que existe una amplia variabilidad genética dentro de cada una de ellas. El análisis secuencial indica que estos virus sufren numerosas mutaciones arbitrarias y recombinaciones intragénicas (Murtaugh y cols., 1995; Kapur, 1996).

2.4.2.2 EPIDEMIOLOGÍA

En el estudio de la epidemiología de esta enfermedad, se establece que la forma más frecuente de transmisión es la directa, incluyendo el contacto directo con animales infectados o mediante semen contaminado.

El PRRSv puede eliminarse a través de una gran cantidad de secreciones y excreciones del cerdo incluyendo sangre, semen, saliva, heces, aerosoles, leche y calostro (Yoon y cols., 1993; Rossow y cols., 1994a; Swenson y cols., 1994a; Wills y cols., 1997b; Wagstrom y cols., 2001). La eliminación del virus a través de las heces está en discusión ya que, algunos autores han sido capaces de detectar el virus desde los 28 – 35 días después de la inoculación experimental, mientras que otros no detectan el virus en muestras fecales (Wills y cols., 1997b; Yoon y cols., 1993).

Se ha descrito también transmisión vertical durante el segundo y último tercio de gestación (Christianson y cols., 1993).

Además, se describe la transmisión indirecta, siendo los fómites, las botas y la ropa de trabajo (Otake y cols., 2002a) fuentes potenciales de contagio en las naves de cerdos. Los vehículos de transporte también son considerados una importante fuente de transmisión mecánica del PRRSv (Dee y cols., 2005). Otro vehículo de transporte mecánico son los insectos como los mosquitos (*Aedes vexans*) y moscas (*Musca domestica*), que son capaces de transportar al virus en su aparato digestivo (Otake y cols., 2002b; Otake y cols., 2003; Otake y cols., 2004)

Es muy difícil encontrar estimaciones precisas de la prevalencia de la infección por el virus de campo en países o regiones específicos. El uso, a nivel mundial, de vacunas vivas atenuadas no permite diferenciar a los cerdos vacunados de los infectados. Por otra parte, los virus atenuados vacunados pueden transmitirse entre animales (Botner y cols., 1997; Christopher-Hennings y cols., 1997), por lo que resulta muy complicada esta estimación. Sin embargo, la prevalencia de la enfermedad se presupone elevada en los países de mayor producción, asumiéndose que el 60-80% de las explotaciones están infectadas (Zimmerman y cols., 2012). De datos parciales de algunos trabajos publicados, se considera que, si no ha existido un control efectivo de la enfermedad, la infección se encuentra presente en más del 70% de las explotaciones afectando a más del 50% de los cerdos (Hirose y cols., 1995). En Estados Unidos, los primeros trabajos realizados describieron una seroprevalencia del 82,8% y del 57,2% de las explotaciones y animales analizados, respectivamente (Bautista y cols., 1993). Algunos autores describieron en 1997 en Corea, una prevalencia de reproductoras y de explotaciones seropositivas a PRRSv de 45,2% y 69,4%, respectivamente (Cheon y cols., 1997). En Europa se cree que las explotaciones están infectadas de forma endémica, con valores superiores al 50% en cerdas reproductoras y prácticamente la totalidad de animales de cebo (Maes, 1997; Nodelijk y cols., 2003).

Sin embargo, existen numerosos trabajos en los que se describe la seroprevalencia de PRRSv en animales salvajes de vida libre o criados en explotaciones y en el cerdo ibérico. Estos trabajos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 5: Estudios de prevalencia de PRRSv realizados en animales de salvajes y cerdo ibérico. Descrito en animales salvajes de vida libre(*) o criados en explotaciones(**), así como en el cerdo ibérico (***).†Caso clínico. *LTb, lavado traqueobronquial.*

Referencia	País	Periodo de estudio	Nº	Muestra	Prevalencia	Técnica diagnóstica
Oslage y cols., 1994	Alemania	1991-1992	659*	Suero	0,3%	IPMA
Saliki y cols., 1998	Oklahoma	1996	117*	Suero	1,7%	ELISA - IFI
Gipson y cols., 1999	Kansas	1993-1994	20*	Suero	0%	IFI
Albina y cols., 2000	Francia	1993-1995	603* 303**	Suero	1,33% 8,25%	ELISA
Zupancic y cols., 2002	Croacia	1999	44*	Suero	0%	ELISA (IDEXX)
Vicente y cols., 2002	España	1999-2000	78*	Suero	0%	ELISA (Ingenasa)
Vengust y cols., 2006	Eslovenia	2003-2004	178*	Suero	0%	ELISA (IDEXX)
Bonilauri y cols., 2006	Italia	2005	1*†	Pulmón	+	PCR
Ruiz-Fons y cols., 2006	España	2000-2003	123*	Suero	0%	ELISA (IDEXX)
Kukushkin y cols., 2008	Rusia	2002-2003 2004-2005	90*	Suero Pulmón, LNs y bazo	0% 0%	ELISA (propio) RT-PCR
Corn y cols., 2009	Carolina (Norte y Sur)	2006-2007	120* 49*	Suero	0,8% (1) 0%	ELISA (IDEXX)

Reiner y cols., 2009	Alemania	2004-2007	531*	Pulmón Tonsila	15,9% (UE: 6,2%; US: 14,2%)	Multiplex nPCR (cepa europea y americana)
Montagnaro y cols., 2010	Italia	2005-2006	342*	Suero	37,8% (129)	ELISA
Wu y cols., 2011	Suecia	2008-2010	233*	Suero	0,4%	ELISA (IDEXX) RT-PCR
Stankeviciu s y cols., 2011	Lituania	2008-2010 2007-2011	659*	Suero	6,5% 8,2%	ELISA(IDEXX, Ingenasa y otros) RT-PCR
Baker y cols., 2011	Texas Oklahoma Arkansas Louisiana	---	50*	Suero	2%	ELISA (IDEXX)
Closa-Sebastià y cols., 2011	España	2004-2007	273*	Suero	3%	ELISA
Sattler y cols.,2012	Alemania	---	94*	Suero	1,2%	ELISA (IDEXX)
Roic y cols., 2012	Croacia	2005-2006 2009-2010	556*	Suero	9,7% 0%	ELISA (IDEXX)
Halli y cols., 2012	Finlandia	2005-2008	301**	Suero	0%	ELISA
Hammer y cols., 2012	Alemania (Suroeste)	2008-2009	203*	Suero Pulmón y tonsila	0,49% 0%	ELISA qPCR
Boadella y cols., 2012	España	2000-2009	407*	Suero	2,1%	ELISA (IDEXX)
Choi y cols., 2012	Corea	2010-2011	267*	Suero	1,5% 3,0%	ELISA (Oxoid) RT-PCR
Rodríguez-Prieto y cols., 2013	España	2002-2010	294* 80***	Suero Suero	2,04% 1,25%	ELISA (IDEXX)
Stephenson y cols., 2015	Oahu y Hawai	2007-2010	344*	Suero	5,8%	FMIA
Baroch y cols., 2015	Estados Unidos	2011 y 2012	162*	Suero	2,5%	(ELISA) IDEXX
Marinou y cols., 2015	Grecia	2012 y 2013	359**	Suero	5,6%	ELISA

2.4.2.3 PATOGENIA

Entre las propiedades de este virus se incluye la capacidad de inducir una viremia prolongada, una infección persistente y la replicación viral en los macrófagos (Plagemann y Moennig, 1992).

El PRRSv utiliza como células diana para replicarse principalmente a los PAMs, además de otras células del sistema mononuclear fagocítico, tales como los PIMs, macrófagos de linfonodos y bazo y macrófagos intravasculares de la placenta y cordón umbilical (Duan y cols., 1997; Lawson y cols., 1997; Thanawongnuwech y cols., 2000). Gran parte de estos estudios de patogenicidad han permitido detectar Ag del virus del PRRSv o su ARN además, en células endoteliales, en fibras de musculatura lisa y fibroblastos (Pol y cols., 1991; Larochelle R, 1994; Halbur y cols., 1995c; Magar y cols., 1995; Larochelle R, 1995; Larochelle R, 1996; Rossow y cols., 1996a; Rossow y cols., 1996b; Sur y cols., 1996; Haynes y cols., 1997; Larochelle y Magar, 1997).

La capacidad de latencia es una característica del grupo de los Arterivirus (Moennig, 1992; Plagemann y Moennig, 1992). Los mecanismos por los cuales el virus del PRRS logra evadir el sistema inmune son desconocidos. Existen numerosos estudios que intentan determinar la duración de este periodo de latencia, pero con resultados muy variables (Batista y cols., 2002; Horter y cols., 2002).

Se ha descrito, en infecciones intrauterinas de fetos, la detección de lechones seropositivos a PRRSv desde los 85-90 días de gestación hasta el día 210 post-parto. Al poner a estos animales infectados (98 días post-parto) con centinelas, éstos últimos presentan Acs anti-PRRSv 14 días después de producirse el contacto (Benfield y cols., 1997). Además, se ha demostrado que la persistencia del virus puede presentarse hasta 154-157 días post-infección (Albina y cols., 1994; Otake y cols., 2002a).

2.4.2.4 CLÍNICA

Numerosos trabajos describen signos clínicos de PRRS similares en explotaciones de porcino de America, Europa y Asia. Siendo la presentación clínica muy variable en función de la explotación, con rangos que van desde asintomáticas a devastadoras. Estos signos clínicos vienen influenciados por la variante del virus, el estado inmunológico del hospedador, la susceptibilidad del hospedador, las posibles coinfecciones con otros agentes patógenos y factores de manejo (Zimmerman y cols., 2012).

Los signos clínicos en las cerdas son muy inespecíficos pudiendo ser imperceptibles o presentar cuadros de anorexia, fiebre, letargia, neumonía, agalaxia, coloración rojo azulada orejas y vulva, edema subcutáneo y en miembros posteriores, retraso de la aparición del estro post-destete y muerte (Terpstra y cols., 1991a; Anonymous, 1992; Hopper y cols., 1992; Mengeling y cols., 1994; Swenson y cols., 1994b; Done y Paton, 1995; Epperson y Holler, 1997). La mortalidad en las cerdas ronda el 1-4% durante la fase aguda de la enfermedad, estando asociada a edema pulmonar y/o cistitis/nefritis (Hopper y cols., 1992). En algunos casos severos de PRRS agudo se puede observervar entre 10-50% de abortos con una mortalidad de hasta el 10% y sintomatología nerviosa (Epperson y Holler 1997).

En neonatos infectados intrauterinamente, se observa anorexia, fiebre, disnea y taquipnea, edema periocular y palpebral, conjuntivitis, cianosis en las orejas, eritema cutáneo, diarrea, convulsiones, pelo áspero y sintomatología nerviosa, después del nacimiento (Loula, 1991; Ohlinger y cols., 1991; Wensvoort y cols., 1991; Anonymous, 1992; Busse y cols., 1992; Hopper y cols., 1992; Paton y cols., 1992; Fichtner y cols., 1993; Albina y cols., 1994; Rossow y cols., 1994a; Cooper y cols., 1995; Rossow y cols., 1995; Swenson y cols., 1995; Rossow y cols., 1999).

En los lechones destetados, la clínica se caracteriza por presentar fiebre, neumonía, letargia, retraso en el crecimiento y un marcado incremento de la mortalidad sólo o por co-infecciones bacterianas (Terpstra y cols., 1991a; Loula, 1991; Busse y cols., 1992; Rossow y cols., 1994b). Las co-infecciones bacterianas asociadas a infecciones por PRRSv, complican el cuadro clínico provocando además un incremento en la mortalidad de los lechones destetados (de un 1-2% a un 10-15%) (Done y cols., 1992; Hopper y cols., 1992; Stevenson y cols., 1993; Zeman y cols., 1993; Done y Paton, 1995 Kubo y cols., 1995; Zeman, 1996).

2.4.2.5 LESIONES MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS

- ✓ ***Lesiones macroscópicas***

Las lesiones macroscópicas asociadas a la infección producidas por PRRSv varían ampliamente y puede depender de la cepa del virus aislado, de la genética del hospedador y de los factores estresantes (Halbur y cols., 1995a; Halbur y cols., 1995c; Kristensen, 1995; Rossow y cols., 1995). Las lesiones en pulmones pueden variar, siendo en algunos casos imperceptibles macroscópicamente hasta presentar una consolidación difusa y, frecuentemente, complicadas secundariamente por otros agentes bacterianos y/virales (Collins y cols., 1992; Done y cols., 1992; Hopper y cols., 1992; Halbur y cols., 1993b; Done y Paton, 1995; Halbur y cols., 1995b). Los linfonodos afectados, frecuentemente en cerdos jóvenes, presentan linfoadenomegalia (Ohlinger y cols., 1991; Rossow y cols., 1994b; Done y Paton, 1995; Halbur y cols., 1995a; Halbur y cols., 1995b; Rossow y cols., 1995).

- ✓ ***Lesiones microscópicas***

Se observan con mayor frecuencia en pulmón y tejido linfoide. Las lesiones en pulmón se caracterizan por engrosamiento de los septos, necrosis de los alvéolos con pérdida de la estructura normal y presencia de macrófagos y de forma ocasional algunas células sincitiales, hipertrofia e hiperplasia de neumocitos tipo II de las paredes alveolares, hiperplasia del BALT e infiltrado linfoplasmocitario perivascular, tanto en casos de infecciones experimentales como naturales (Collins y cols., 1992; Done y cols., 1992; Halbur y cols., 1993b; Cooper y cols., 1995; Done y Paton, 1995; Halbur y cols., 1995b; Kubo y cols., 1995; Rossow y cols., 1995).

Las lesiones en tejido linfoide se caracterizan por presentar hiperplasia del centro germinativo con necrosis y espacios quísticos con policariocitos (Collins y cols., 1992; Rossow y cols., 1994b; Cooper y cols., 1995; Halbur y cols., 1995a; Halbur y cols., 1995c; Rossow y cols., 1995).

En condiciones de campo, las lesiones producidas por PRRSv en los pulmones, frecuentemente aparecen asociadas y en ocasiones enmascaradas por lesiones de origen bacteriano; en estos casos debemos tener en cuenta que la infección por el PRRSv además puede generar lesiones en otros tejidos, siendo de utilidad para el diagnóstico en caso de existir lesiones bacterianas concomitantes en el pulmón.

Así, se ha encontrado lesiones en vasos sanguíneos y linfáticos (Collins y cols., 1990; Done y cols., 1992; Goovaerts y Visser, 1992; Halbur y cols., 1993b; Paul y cols., 1993; Stockhoff-Zurwieden y cols., 1993; Rossow y cols., 1995; Rossow y cols., 1996b); en corazón (Halbur y cols., 1993b; Rossow y cols., 1994b; Cooper y cols., 1995; Halbur y cols., 1995b; Kubo y cols., 1995; Rossow y cols., 1995; Rossow y cols., 1996b; Rossow y cols., 1999); en cerebro, aunque no suelen ser muy frecuentes (Collins y cols., 1992; Rossow y cols., 1994b; Halbur y cols., 1995b; Kubo y cols., 1995; Rossow y cols., 1995); en cornetes nasales, en fases tardías de la infección (Rossow y cols., 1994b; Halbur y cols., 1995b; Kubo y cols., 1995; Rossow y cols., 1995; Rossow y cols., 1996a); es muy raro observar nefritis (Rossow y cols., 1995; Rossow y cols., 1996a) y se han descrito algunos casos de hepatitis inespecíficas en infecciones producidas por la cepa europea del PRRSV (Pol y cols., 1991) y lesiones en la capa muscular del estómago en cerdos gnotobiótico y en condiciones de campo (Rossow y cols., 1995; Rossow y cols., 1999).

2.4.2.6 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de una infección de PRRSv se basa en los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y el examen histopatológico de las lesiones observadas (Pol y cols., 1991; Dea y cols., 1992; Botner y cols., 1994). Sin embargo, el diagnóstico definitivo requiere la detección de PRRSv o de Acs en los animales infectados mediante la realización de diversas técnicas laboratoriales directas o indirectas.

En los casos donde no se presentan fallos reproductivos, el pulmón es el órgano diana para la replicación del virus, permaneciendo en los PAMs y PIMs hasta las 9 semanas después de la infección (Rossow y cols., 1995; Mengeling y cols., 1996b).

Para el aislamiento del virus se pueden emplear numerosas muestras de cerdos con diferentes edades, débiles o con sintomatología respiratoria (Pol y cols., 1991). El pulmón, bazo, linfonodos y suero son muestras válidas para el aislamiento. Los pulmones, bazo, sangre cardiaca y fluidos torácicos de recién nacidos y fetos abortados también son adecuados. El virus puede ser aislado de pulmón, suero, plasma y células leucocitarias a partir de la 6-8 semanas post-infección (Pol y cols., 1991; Ohlinger y cols., 1992) y de tejidos congelados durante 2-4 años (Frey y cols., 1992).

La primera IHQ para la detección del PRRSv fue descrita en 1993 y desde entonces se han ido publicando otros métodos como el empleo del complejo Streptavidina Biotina inmunoperoxidasa, la Inmuno-tinción de oro y plata (IGSS), la ISH o el uso de oro coloidal en la IHQ (Magar y cols., 1993; Halbur y cols., 1994; Larochelle R, 1995; Rossow y cols., 1996a; Larochelle y Magar, 1997). Las lesiones de neumonías producidas por PRRSv son las muestras de elección, para detectar Ag del virus (Rossow y cols., 1995; Rossow y cols., 1996a). No obstante, también se ha demostrado en otros tejidos, como tejido linfoide, corazón, cerebro, cornetes nasales, conductos deferentes, epidídimo, próstata, testículo y glándulas bulbouretrales (Halbur y cols., 1995b; Christopher-Hennings y cols., 1996; Rossow y cols., 1996a; Shin y cols., 1996). Una aportación metodológica realizada por Rossow (*comunicación personal*, 1998), quién observó que aquellos tejidos fijados en formaldehído al 10%, a partir de las 48h empiezan a perder Ags de PRRSv detectables.

Para muestras congeladas, la inmunofluorescencia directa es el método de elección para la detección del virus en muestras de pulmón (Meulenberg y cols., 1995; Rossow y cols., 1995).

La PCR y más concretamente, la RT-PCR constituye una herramienta válida para la detección del virus en muestras con reducida carga infectiva (Suarez y cols., 1994; Van Woensel y cols., 1994), pudiendo diferenciar la cepa americana de la europea (Mardassi y cols., 1994).

Por otro lado, el análisis serológico es el método empleado para evaluar de forma indirecta la presencia de PRRSv en una explotación. Los test serológicos para PRRSv no permiten diferenciar Acs vacunal de Acs por infección en aquellas explotaciones en las que se emplean vacunas con virus vivos modificados (Groschup y cols., 1993; Mengeling y cols., 1996a; Cheon y cols., 1997; Albina y cols., 2000; Stankeviciu y cols., 2011). La técnica serológica empleada con mayor frecuencia es el ELISA (HerdChek-PRRSV, IDDEX Laboratories Inc., Westbrook, ME) (Collins y cols., 1996), pudiendo detectar Acs anti-PRRSv entre los 9-13 días post-infección.

En la realización de técnicas de PCR, técnicas serológicas y otras se han empleado numerosos tipos de muestra entre los que cabría destacar suero sanguíneo, fluidos orales y jugos de carne (Molina y cols., 2008a, Prickett y cols., 2008 a y b; Fabisiak y cols., 2013; Kittawornrat y cols., 2014).

2.4.3 CIRCOVIRUS PORCINO TIPO 2

2.4.3.1 ETIOLOGÍA

Perteneciente a la familia *Circoviridae,* junto con el género *Gyrovirus* (*gyrus*: circuito o anillo), el género *Circovirus* se subdivide a su vez en distintas especies, entre ellas Circovirus porcino (PCV); PCV1 (apatógena) y PCV2 (patógena para el cerdo) (Meehan y cols., 1997; Niagro y cols., 1998).

Presentan una simetría icosahédrica y carecen de envoltura, con un genoma circular de cadena simple de entre 1,8 y 2,3 kb dispuesto en ambos sentidos.

Fue descrito por primera vez por Tischer y cols. (1974), como contaminante en una línea celular de riñón de porcino (PK-15). En condiciones experimentales, este Circovirus aislado a partir del PK-15 no producía enfermedad en el cerdo (Tischer y cols., 1986; Allan y cols., 1995; Krakowka y cols., 2000).

En los años 90, se asoció PCV a una enfermedad emergente, conocida con el nombre de síndrome multisistémico de adelgazamiento post destete (*post-weaning multisystemic wasting syndrome,* PMWS) (Allan y cols., 1998; Meehan y cols., 1998; Choi y Chae, 1999; Choi y cols., 2000; Kim y cols., 2002; Kim y cols., 2001; Pallares y cols., 2002).

El análisis de la secuencia del PCV asociado al PMWS reveló diferencias genéticas significativas al compararlo con el PCV asociado al PK-15 (Ellis y cols., 1998; Hamel y cols., 1998; Meehan y cols., 1998; Morozov y cols., 1998; Allan y cols., 1999b), por ello PCV se dividió en: PCV2, patógeno para el cerdo asociado al PMWS y PCV1, apatógeno para el cerdo, presentando una homología entre ambas secuencias del 68-76%.

En trabajos retrospectivos realizados en distintos países se ha identificado tanto PCV1 como PCV2, tal y como queda resumido en la siguiente tabla:

Tabla 6: Identificación de PCV (PCV1/PCV2) en estudios retrospectivos.

REFERENCIA	PERÍODO	PAÍS	MUESTRA (TÉCNICA)	PCV
Magar y cols., 2000b	1985-1997	Canadá	Sueros (IFA)	PCV1/PCV2
Walker y cols., 2000	1973-1999	Irlanda del Norte	Sueros	PCV2
Sanchez y cols., 2001	1969 1970 2000	Bélgica	Sueros matadero (IPMA)	PCV2
Grierson y cols., 2004	1970-1995 1995-1997	Reino Unido	Tejidos	PCV2
Staebler y cols., 2005	1976-2001	Suiza	Tejidos (IHQ)	PCV2
Ramirez-Mendoza y cols., 2009	1972-2000	México	Sueros (IPAM)	PCV2
Rodriguez-Arrioja y cols., 2003	1985-1997	España	Tejidos (ISH) Sueros (IPAM)	PCV2

2.4.3.2 EPIDEMIOLOGÍA

La transmisión de PCV2 puede ocurrir por contacto directo vía oronasal, fecal y urinaria (Magar y cols., 2000a; Bolin SR, 2001), considerándose la vía oronasal como la vía más frecuente de trasmisión de PCV2, en relación a los resultados obtenidos de numerosos estudios experimentales (Allan y cols., 1999a; Balasch y cols., 1999; Ellis y cols., 1999; Krakowka y cols., 2000; Krakowka y cols., 2001; Rovira y cols., 2002).

Para intentar reproducir experimentalmente el PMWS, también se ha utilizado la inoculación intranasal y subcutánea con PCV2 (Pogranichnyy y cols., 2000; Bolin SR, 2001). La inoculación del material genético de PCV2 vía intramuscular, intraperitoneal o directamente en hígado o nódulos linfáticos de cerdos ha inducido infección y lesiones histopatológicas compatibles con PMWS (Fenaux y cols., 2002; Roca y cols., 2004).

La trasmisión transplacentaria se ha reproducido (transmisión vertical) mediante la inoculación intranasal de PCV2 en reproductoras (Park y cols., 2005). Sin embargo, la frecuencia de la transmisión vertical en condiciones naturales es muy variable, existiendo muy pocos casos descritos en Europa (Pensaert y cols., 2004; Maldonado y cols., 2005), en contraposición con los datos recogidos en Corea, que demuestran la presencia de PCV2 en un 13% de los fetos abortados y lechones nacidos muertos (Kim y cols., 2004b). También se ha identificado la presencia de PCV2 en muestras de semen de cerdos inoculados experimentalmente (Larochelle y cols., 2002).

En relación a la transmisión horizontal en infecciones naturales, los cerdos seroconvierten a PCV2 entre las 2-4 semanas de edad, (Larochelle y cols., 2003; Sibila y cols., 2004) indicando que la transmisión horizontal de PCV2 entre los cerdos es muy eficiente. Esta transmisión horizontal se ha demostrado también en condiciones experimentales al poner en contacto cerdos susceptibles con cerdos infectados (Albina y cols., 2001; Bolin SR, 2001).

PCV2 ha sido detectado mediante PCR en cavidad nasal, tonsilas, secreciones bronquiales, heces y orina de cerdos afectados y no afectados de PMWS de forma natural (Calsamiglia y cols., 2004; Sibila y cols., 2004), así como de exudados nasal, rectal, urinario, salivar, ocular y tonsilar en cerdos infectados experimentalmente (Krakowka y cols., 2000; Bolin SR, 2001; Shibata y cols., 2003), y mediante ISH de cavidad nasal y tonsila pero sin llegar a determinar si esta carga viral se debe a una secreción del virus o a la presencia del mismo formando parte de la flora “habitual” (Segalés y cols., 2004).

Estudios retrospectivos han detectado la infección por PCV en cerdos desde 1962 (Jacobsen y cols., 2009), aunque posiblemente haya estado presente en la población porcina desde mucho antes (Opriessnig y Langohr, 2013). PCV es un virus ubicuo en la población porcina. PCV1 se ha detectado en poblaciones de cerdos salvajes (jabalíes). Igualmente, PCV2 también es ubicuo y tanto el cerdo salvaje como el doméstico son hospedadores naturales (Segalés, 2012). En España se describe una seroprevalencia del 70% en cerdos híbridos (Rodríguez-Arrioja y cols., 2003). Numerosos estudios recogen la prevalencia de PCV2 en jabalíes de todo el mundo (Tabla 7).

Tabla 7: Estudios de prevalencia de PCV2 realizados en animales salvajes y cerdo ibérico. Descrito en animales salvajes de vida libre(*) o criados en explotaciones(**), así como en el cerdo ibérico (***).†Caso clínico. *LnB/LnMs/LnIS, linfonodos bronquial, mesentéricos e inguinal superficial.*

REFERENCIA	PAÍS	PERIODO DE ESTUDIO	Nº	MUESTRA	PREVALENCIA	TÉCNICA DIAGNÓSTICA
Vicente y cols., 2004	España	2002-2003	656* 56*	Suero Pulmón, Ln, Hígado, Bazo y/o Riñón	47,9% 1,8% +/+ 3,6% -/+	IPMA H&E/ISH
Knell y cols., 2005	Alemania	2003-2004	238*	Bazo	18,1%	PCR
Csagola y cols., 2006	Hungría	2002-2003	307*	Riñón Bazo Hígado Lns	20,5%	PCR
Ruiz-Fons y cols., 2006	España	2000-2003	272*	Suero	51,8%	IPMA
Lipej y cols., 2007	Croacia	2004	8*†	LnMs	100%	PCR
Sedlak y cols., 2008	Republica Checa	1999-2005	134*	Suero	43%	IFI
Corn y cols., 2009	Carolina (Norte y Sur)	2006-2007	120* 49*	Suero	72% 59%	ELISA (Synbiotics Europe)
Petrini y cols., 2009	Italia	2006	16*†	Pulmón, LnB y tonsila	100% 6,23% (1 LnB)	PCR IHQ
Reiner y cols., 2010	Alemania	2004-2007	349* *vs* 348~	LnB y LnMs, Tonsila, Bazo y Pulmón	0,3 *vs* 8,7% 63,1 *vs* 100% 45,4 *vs* 98,8%	Clínica/HE/IHQ nPCR qPCR
Baker y cols., 2011	Texas Oklahoma Arkansas Louisiana	sd	50*	Suero	42%	ELISA (Synbiotics)
Closa-Sebastià y cols., 2011	España	2004-2007	271*	Suero	64,6%	IPMA
Turcitu y cols., 2011	Rumanía	2008-2009	212*	Bazo	43,68%	PCR
Fabisiak y cols., 2012	Polonia	2006-2008	312*	Tonsila	75,6%	RT-PCR
Hammer y cols., 2012	Alemania	2008-2009	203*	Suero Tonsila-Pulmón	(26% IgG 2% IgM) (56,4% IgG) 50,7% (103)	ELISA (IgG/IgM) (IgG) qPCR
Roic y cols., 2012	Croacia	2005-2006 2009-2010	359* 197*	Suero	18,7% 8,6%	ELISA (Ingenasa) (+) IgM>IgG
Morandi y cols., 2012	Italia	sd	72*	LnIS	13,9% 15,3%	IHQ PCR
Sattler y cols.,2012	Alemania	---	94	Suero	16% (IgG) 3,2% (IgG+IgM)	ELISA (Ingenasa)
Halli y cols., 2012	Finlandia	2005-2008	294**	Suero	51,1%	IPMA
Boadella y cols., 2012	España	2000-2008	818*	Suero	51,3%	IPMA

Stephenson y cols., 2015	Oahu y Hawai	2007-2010	344	Suero	63%	FMIA
Baroch y cols., 2015	Estados Unidos	2011 y 2012	162*	Suero	25,3%	IF

2.4.3.3 PATOGENIA

La patogenia de la infección de PCV2 así como el tipo celular en el que tiene lugar la replicación del virus, aún no se conocen completamente. La depleción linfoide así como la linfopenia que tiene lugar en sangre periférica es un rasgo constante en los cerdos infectados, que desarrollan clínicamente dando lugar al desarrollo de enfermedades.

Mediante el uso de técnicas de IHQ e ISH se ha demostrado grandes cantidades de Ags o material genético de PCV2 en el citoplasma de los macrófagos y en células dendríticas reemplazando a los linfocitos en los folículos deplecionados (Sorden, 2000; Allan y Ellis, 2000; Chianini y cols., 2001). Sin embargo, la presencia de Ags de PCV2 en linfocitos es esporádica (Chianini y cols., 2003), y aún se desconoce si la reducción de linfocitos en cerdos afectados por PCVD es debida a una producción reducida en la médula ósea, a una reducción de la proliferación en los tejidos linfoides secundarios o a un incremento de la pérdida de linfocitos en médula ósea, sangre periférica, o en tejidos linfoides secundarios vía necrosis o apoptosis inducida por el virus (Opriessnig y cols., 2007).

A pesar de la presencia de PCV2 en macrófagos y células dendríticas, algunos autores sugieren que las células monocíticas no representan la célula blanco principal de la replicación del PCV2. En dicho estudio se analizó la capacidad de los monocitos y los macrófagos de mantener la replicación de PCV2 in vitro, y no se observó replicación en las mismas (Gilpin y cols., 2003).

Otros autores no encontraron evidencia de replicación *in vitro* en células dendríticas. Sin embargo, el PCV2 persistía en estas células sin perder infectividad o inducir la muerte celular y sostienen la hipótesis de que debido a su capacidad migratoria, las células dendríticas podrían proporcionar un vehículo para el transporte del virus a través del hospedador (Vincent y cols., 2003). Otros trabajos realizados in vitro e in vivo sugieren que el PCV2 sí podría replicarse en macrófagos (Pérez-Martín y cols., 2007; Rodríguez-Cariño y Segalés, 2009).

No se ha determinado aún cuál es la ruta de entrada del PCV2 en las células diana. Sin embargo, algunos resultados preliminares obtenidos *in vitro* han mostrado que el PCV2 entra en dichas células mediante endocitosis dependiente de clatrina en un ambiente ácido (Misinzo y cols., 2005). Además, se ha demostrado que las células dendríticas maduras e inmaduras permiten la internalización del PCV2 mediante micropinocitosis en ausencia de replicación vírica (Vincent y cols., 2005).

Aunque muchos aspectos de la patogenia del PCV2 están aún pendientes de una confirmación e identificación definitiva, se ha propuesto un esquema de la patogenia de los cerdos que presentan enfermedad por PCV2 sistémica e infectados de forma subclínica por PCV2 en relación a los aspectos inmunológicos de la enfermedad (Darwich y cols., 2004).

Para intentar esclarecer el papel que ejerce PCV2 en la presentación de la enfermedad y explicar algunas manifestaciones clínicas atribuidas únicamente a este virus, se intento reproducir la infección con ADN clonado de PCV2, inoculando cerdos libres de agentes patógenos (SPF), los cuales desarrollaron lesiones en órganos linfoides asociadas a PCV2, aunque no evidenciaron clínica (Fenaux y cols., 2002). Estudios similares se han desarrollados posteriormente por Grasland y cols., en el 2005. Todos estos

trabajos sugieren la hipótesis de que PCV2 es esencial para el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, la presencia de otros factores es imprescindible para poder explicar la gran variabilidad de signos clínicos y lesiones asociadas a los casos crónicos de animales infectados por PCV2 (Opriessing y cols., 2007).

En estudios restrospectivos se ha observado que diversos factores, tales como la edad y el origen de los cerdos, condiciones ambientales, la genética de los animales y la naturaleza del inóculo de PCV2 pueden jugar un importante papel en la reproducibilidad experimental de la enfermedad (Segalés y cols., 2005a). Los factores que actualmente se piensa puedan influir en el desarrollo de enfermedades debidas a una infección por PCV2 pueden desglosarse en 4 grupos: virus, hospedador, coinfecciones y modulación inmune. Los trabajos experimentales han confirmado que al menos estos 4 componentes, identificados hasta la fecha, son claves en los distintos modelos etiopatogenicos (Opriessing y cols., 2007).

2.4.3.4 CLÍNICA Y LESIONES

El nombre de la enfermedad atribuida a la infección por PCV2 ha ido evolucionando conforme se ha profundizado en el conocimiento e identificación del virus, así como las diferentes presentaciones clínicas y cuadros lesionales.

En 1996, se publicó la descripción de un síndrome de adelgazamiento o desmedro observado por primera vez en 1991, en explotaciones de alto estatus sanitario en Canadá (Clark, 1996; Harding, 1996). Se caracterizaba por la pérdida progresiva de la condición corporal junto con la presencia de lesiones en múltiples órganos y los autores propusieron el término PMWS. En las lesiones multisistémicas se detectó ácido nucleico y Ag de PCV2, consiguiendo aislar y caracterizar el virus (Ellis y cols., 1998). En California, se asoció PCV a la neumonía intersticial y linfadenopatía observadas en muestras de pulmón y linfonodos en un cerdo de 6 semanas de edad al detectarse, mediante ISH, ADN de PCV (Daft y cols., 1996). Demostrándose posteriormente, mediante aislamiento y caracterización del virus, que se trataba del PCV2 (Allan y cols., 1998). En Francia en 1996, se describió una enfermedad debilitante (Albina y cols., 1996), identificándose PCV2 en los animales afectados (Allan y cols., 1998). Un año más tarde en España, también fue descrita una enfermedad asociada al PCV2 que cursaba con adelgazamiento (Segalés y cols., 1997).

Desde estos primeros casos descritos de PMWS asociado a PCV2, dicha enfermedad ha sido identificada en casi todos los países productores de porcino en el mundo (Clark, 1997; Harding, 1997; Segalés y cols., 1997; Kiupel y cols., 1998; Spillane y cols., 1998; Choi y Chae, 1999; Hinrichs y cols., 1999; Onuki y cols., 1999; Choi y cols., 2000; Kiss y cols., 2000; Vyt y cols., 2000; Wellenberg y cols., 2000; Borel y cols., 2001; Trujano y cols., 2001; Celer y Carasova, 2002; Sarradell y cols., 2002; Saoulidis y cols., 2002; Lawton y cols., 2004; Wallgren y cols., 2004).

Estudios retrospectivos realizados en España, Reino Unido y Japón, en muestras de cerdos procedentes de archivos histológicos desde 1986 y 1989, en los cuales se diagnosticaron lesiones de PMWS, se detectó abundantes Ags de PCV2 (Mori y cols., 2000; Rodríguez-Arrioja y cols., 2003; Grierson y cols., 2004). En otros estudios se han encontrado evidencias de infección por PCV2 en cerdos desde 1969 (Sánchez y cols., 2001b).

Dado que el PCV2 es ubicuo en la población porcina y la infección no equivale necesariamente a enfermedad, Sorden, en 2000, propuso una definición de caso de PMWS. Basándose en dicha definición, el diagnóstico de PMWS requiere 1) la presencia de signos clínicos tales como debilidad, perdida de peso, con o sin disnea o ictericia; 2) la presencia de lesiones microscópicas típicas asociadas a PCV2 (depleción linfoide y/o infiltrado histiocítico en tejidos linfoides u otros órganos), y 3) antígeno o ácido nucleico de PCV2 asociado a las lesiones microscópicas, detectado mediante IHQ o ISH (Sorden, 2000).

En 2002, se propuso reemplazar todas las abreviaturas existentes que intentaban identificar a esta enfermedad emergente por "enfermedades por circovirus porcino (*Porcine Circovirus Disease* PCVD) para agrupar a todos los cuadros clínicos asociados con el PCV2 (Allan y cols., 2002). Esta nomenclatura también es usada en Europa (Segalés y cols., 2005a). En Norteamérica, en el año 2006, la Asociación Americana de Veterinarios de Porcino consideró que cualquier término nuevo usado en conexión con PCV2 debería incluir la palabra "asociado", lo cual llevó a la creación e introducción del término "enfermedad asociada al circovirus porcino" (*Porcine circovirus associated disease*, PCVAD), y como referencia el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad del Estado de Iowa las dividen en categorías dependiendo del sistema afectado. Así, PCVAD ahora incluye una infección sistémica (categoría que incluye el PMWS), neumonía asociada a PCV2, enteritis asociada a PCV2, fallos reproductivos asociados a PCV2, y al síndrome de dermatitis y nefropatía porcina asociado a PCV2. Los casos que son categorizados de esta forma, pueden tener lesiones asociadas a PCV2 que varíen en severidad de moderada a severa y tales descripciones son añadidas a los informes del caso (Opriessnig y cols., 2007). Así mismo, en 2012 se propuso una terminología para los diferentes síndromes o expresiones de PCVD (Segalés, 2012):

- ✓ Infección subclínica (*PCV2 subclinical infection*, PCV2-SI).
- ✓ Enfermedad sistémica (*PCV2 systemic disease*, PCV2-SD), que incluiría el PMWS.
- ✓ Enfermedad respiratoria (*PCV2 lung disease*, PCV2-LD), que incluiría también la neumonía proliferativa necrotizante (*Proliferative and necrotising Pneumonia,* PNP).
- ✓ Enfermedad entérica o enteritis (*PCV2 enteric disease*,PCV2-ED).
- ✓ Enfermedad o fallo reproductivo (*PCV2 reproductive disease,* PCV2-RD).
- ✓ Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (*Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*, PDNS).
- ✓ Encefalitis y temblor congénito.

Además, como hemos referenciado anteriormente, PCV2 podría jugar un papel importante en la presentación del PRDC, asociada a múltiples patógenos respiratorios incluyendo el PRRSv, SIV y Mh. Afectando a cerdos de 14-22 semanas de edad (Harms y cols., 2002; Kim y cols., 2003a), y causando una reducción en la tasa de crecimiento, una reducción en la eficiencia alimentaria, anorexia, fiebre, tos, y disnea.

- ✓ ***Infección subclínica por PCV2***

La infección subclínica por PCV2 implica que, aunque el PCV2 está presente, no es el responsable de la enfermedad que padezca el cerdo (es decir, baja cantidad de antígeno de PCV2 asociada a lesiones mínimas o sin lesiones). Experimentalmente, se sabe que la infección y lesiones por PCV2 pueden estar limitadas a 1 o 2 linfonodos sin causar ningún signo clínico aparente (Opriessnig y cols., 2004 y 2006a). Por otro lado, se ha demostrado que la infección subclínica por PCV2 puede estar asociada a efectos indirectos, como la disminución en la eficacia de la vacunación frente a PRRSv (Opriessnig y cols., 2006b).

También se ha descrito en cerdos clínicamente sanos, linfadenitis necrotizante asociada a PCV2 en linfonodos individuales. La principal lesión en esta forma de presentación es la presencia en 1 o 2 linfonodos aumentados de tamaño que histológicamente se corresponden con una linfadenitis necrotizante (Kim y Chae, 2005; Opriessnig y cols., 2006a).

- ✓ ***Enfermedad sistémica asociada a PCV2 (PMWS)***

Los principales signos clínicos son pérdida de peso, disminución de la ganancia media diaria, animales pálidos o ictéricos, distrés respiratorio con tos, y diarrea con coloración oscura y en ocasiones ictericia, afectando a cerdos de 2-4 meses de edad en sistemas de producción *out door* e *in door* (Harding y Clark, 1997; Hirai y cols., 2001), con una morbilidad y mortalidad variable, dependiendo de la explotación, el sistema empleado, las prácticas de manejo, posible co-infección con otros agentes etiológicos, etc. Factores medioambientales tales como hacinamiento, aire de mal calidad, mezcla de grupos de diferentes edades, y otros factores estresantes podrían exacerbar la severidad de la infección (Harding y Clark, 1997). Las tasas de morbilidad observadas en las explotaciones afectadas varían de 4 a 30%, y las de mortalidad entre 4 y 20%, con tasas excepcionales de 50-60% de morbilidad y 70-80% de mortalidad (Segalés y Domingo, 2002; Segalés y cols., 2005a).

Un resumen de las lesiones macroscópicas y microscópicas más frecuentes ha sido publicado por Segalés y Domingo, 2002.

Las lesiones macroscópicas más importantes ocurren en el tejido linfoide, caracterizadas por linfoadenomegalia de linfonodos subcutáneos en fases tempranas (Clark, 1997; Rosell y cols., 1999), principalmente inguinal superficial, aunque no siempre se detecta (Segalés y cols., 2004). Este incremento en el tamaño también se distingue fácilmente en los linfonodos bronquial, mediastínicos y mesentéricos. Asimismo, otros linfonodos pueden estar comprometidos. Al corte, presentan una coloración de marronácea a blanquecina y ligeramente edematosa, observándose menos frecuentemente linfadenitis necrótica (Segalés y cols., 2004). En fases más avanzadas se puede apreciar atrofia de linfonodos y timo (Ladekjaer-Mikkelsen y cols., 2002; Darwich, 2003; Segales y cols., 2004), siendo un hallazgo muy significativo en timo la presencia de atrofia cortical (Darwich, 2003). Los pulmones se observan aumentados de tamaño con ausencia de colapso, consistencia elástica, de distribución difusa, irregular o multifocal, con septos distendidos por presencia de edema intersticial. Otro patrón morfológico frecuente en los pulmones es una bronconeumonía catarral-purulenta en los lóbulos anteriores o neumonías necróticas atribuidas a infecciones bacterianas secundarias (Segalés y cols., 2005a). El hígado rara vez aparece aumentado de tamaño, pálido, de consistencia firme y superficie granular (Rosell y cols., 1999; Rosell y cols., 2000a). En el riñón, algunos cerdos muestran un punteado blanquecino en la corteza renal (Segalés y cols., 2004b; Opriessnig y Langohr, 2013). La presencia de úlceras gástricas a nivel de la *pars oesophagea* también ha sido descrita frecuentemente en cerdos afectados de PCV2-SD/PMWS (Segalés y Domingo, 2002) aunque no se ha establecido relación directa entre la infección por PCV2 y estas lesiones.

Las principales lesiones de PMWS a nivel microscópico tienen lugar en los tejidos linfoides aunque también se ha detectado infiltrado inflamatorio asociado a la infección por PCV2 en una gran variedad de tejidos afectados.

Microscópicamente, las lesiones observadas en el tejido linfoide se caracteriza por infiltrado inflamatorio mononuclear histiocítico y células gigantes multinucleadas en senos subcapsulares seguida de depleción linfoide a nivel folicular (pérdida de células B) (Clark, 1997; Rosell y cols., 1999). Las células gigantes multinucleadas también pueden aparecer en los folículos linfoides y en la zona parafolicular, seguida por depleción de linfocitos en la zona parafolicular (celulas T) que puede variar en intensidad, desde leve a muy marcada (Clark, 1997; Rosell y cols., 1999). En el timo se ha descrito atrofia cortical (Darwich, 2003). En numerosas ocasiones se han observado cuerpos de inclusión citoplasmáticos en histiocitos y/o células dendríticas. Dichas inclusiones son basófilas o anfófilas, redondeas y de muy diferente tamaño. Estos cambios están asociados con, a menudo, grandes cantidades de antígeno PCV2 intracitoplasmático en células de la línea monocito-macrofágica incluyendo células dendríticas. Los estadios finales de depleción muestran un tejido linfoide vacío, con un estroma prominente y células accesorias (Rosell y cols., 1999; Segalés y cols., 2005a).

En el aparato respiratorio se observa neumonía intersticial, con infiltrado mononuclear alveolar, peribronquiolar y peribronquial. No se observa un daño evidente en las células epiteliales que tapizan las vías aéreas o los alvéolos. En casos muy avanzados se puede apreciar fibrosis peribronquial y bronquiolitis fibrosa (Clark, 1997; Segalés y cols., 2004). Los septos interlobulillares suelen estar distendidos y con líquido (edema intersticial). Otras lesiones pulmonares frecuentes son bronconeumonía catarropurulenta de los lóbulos anteriores, o incluso neumonía necrotizante, atribuible a infecciones bacterianas secundarias (Segalés y cols., 2005a). En los casos atribuidos a infecciones bacterianas secundarias las lesiones microscópicas están asociados a la presencia de antígeno PCV2, el cual se encuentra a veces intranuclear en células epiteliales y principalmente intracitoplasmático en fagocitos mononucleares (Allan y Ellis, 2000).

Las lesiones microscópicas observadas en hígado de los casos más avanzados se corresponden con pérdida marcada de hepatocitos, un aumento de la cantidad de tejido fibroso e infiltrado inflamatorio difuso (Rosell y cols., 1999; Krakowka y cols., 2000; Rosell y cols., 2000a). En función de la intensidad y distribución de las lesiones microscópicas, el daño hepático observado en animales infectados naturalmente por el PCV2 ha sido clasificado en 4 estadios (Rosell y cols., 2000a): ***I:*** leve infiltrado linfohistiocítico multifocal en torno a los espacios porta. ***II:*** moderado a intenso infiltrado linfohistiocítico en torno a espacios porta e infiltrado mononuclear en el parénquima hepático. Las células de Kupffer suelen estar aumentadas de tamaño y las apoptosis de hepatocitos son infrecuentes. ***III:*** severa inflamación linfohistiocítica en los espacios porta de forma generalizada, infiltrado mononuclear multifocal en el parénquima hepático y, desorganización de los cordones hepáticos. Se pueden observar hepatocitos aumentados de tamaño con cariomegalia. Es frecuente la presencia de cuerpos apoptóticos (Councilman bodies). ***IV:*** fibrosis perilobulillar generalizada, desorganización de los cordones hepáticos y pérdida masiva de hepatocitos con infiltrado mononuclear difuso. La severidad de los daños observados en los hígados clasificados en el estadio IV sugiere la existencia de un fallo hepático en los estadios finales de PCV2-SD/PMWS.

En riñón las lesiones macroscópicas observadas, son indicativas de nefritis intersticial linfoplasmocitaria y/o granulomatosa a nivel microscópico (Segalés y cols., 2004b; Opriessnig y Langohr, 2013), lesión que, a esta edad, se encuentra principalmente en los casos de PCV2-SD/PMWS (Segalés y cols., 2005a). El PCV2 se localiza en el citoplasma de las células epiteliales tubulares (Segalés y Domingo, 2002; Opriessnig y Langohr, 2013).

Otros órganos tales como páncreas, mucosa gástrica e intestinal, corazón, glándulas adrenales, glándulas salivares y medula ósea, pueden presentar también focos de infiltrado inflamatorio mononuclear linfohistiocítico, aunque en menor intensidad y extensión que los principales órganos afectados citados anteriormente (Segalés y cols., 2005a).

La variación de los órganos afectados determina la necesidad de tomar muestras de diversos órganos de varios animales afectados dentro de un mismo grupo puesto que animales clínicamente enfermos pueden tener lesiones severas en un sistema orgánico y no presentar lesiones en otros. No se conocen bien los factores que determinan esta variación en los órganos involucrados, pero podría estar relacionado con la presencia de infecciones secundarias, diferencias en virulencia y tropismo del PCV, estadío de la infección, o con la genética o respuesta inmune del hospedador (Allan y Ellis, 2000).

- ✓ ***Enfermedad respiratoria asociada a PCV2 (incluida PNP)***

Como se ha comentado anteriormente, diversos estudios indican que el PCV2 podría jugar un importante papel en el PRDC (Thacker y Thacker, 2000; Harms y cols., 2002; Kim y cols., 2003b; Hansen y cols., 2010c).

Puede producirse un solapamiento diagnóstico entre PCV2-SD/PMWS, la neumonía asociada a PCV2 y PRDC debido al habitual componente respiratorio del PCV2-SD/PMWS (Harms y cols., 2002; Segalés y Domingo, 2002). Además, casos clínicos diagnosticados como PRDC con presencia de PCV2 en pulmón, donde los tejidos linfoides no han sido examinados, podrían ser, potencialmente, casos de PCV2-SD/PMWS. Por lo tanto, existe un límite borroso entre el PRDC y PCV2-SD/PMWS, debido fundamentalmente a la amplitud de la definición del PRDC (Segales y cols., 2005a; Ticó y cols., 2013).

La presencia de enfermedad respiratoria clínica prolongada y severa, neumonía broncointersticial histiocítica con bronquiolitis y fibrosis bronquiolar, y abundante antígeno de PCV2 asociado con las lesiones, es indicativo de que el PCV2 juega un papel en el PRDC (Kim y cols, 2003b; Opriessnig y cols., 2007).

La neumonía intersticial con bronquiolitis fue descrita en los primeros casos de PCV2-SD/PMWS (Clark, 1997; Ellis y cols., 1998). La neumonía asociada a PCV2 se caracteriza por una neumonía intersticial linfohistiocítica a granulomatosa, fibroplasia o fibrosis peribronquiolar, y bronquiolitis necrotizante y ulcerativa de leve a grave (Kim y cols., 2003b; Opriessnig y cols., 2007; Segalés, 2012). La bronquiolitis asociada a PCV2 puede parecerse a la producida por SIV o por el coronavirus respiratorio porcino (Opriessnig y cols., 2007). Se han descrito casos de neumonía con bronquiolitis obliterante organizada (Cheng y cols., 2011) así como neumonía proliferativa necrotizante (PNP *Proliferative and necrotising Pneumonia)* o casos de neumonía intersticial aguda severa (Szeredi y Szentirmai, 2008).

Según la clasificación de Segalés en 2012, la neumonía proliferativa y necrotizante (proliferative and necrotizing pneumonia, PNP) quedaría incluida dentro de las enfermedades respiratorias por PCV2.

La neumonía proliferativa necrotizante es una forma severa de neumonía intersticial descrita por primera vez en Canadá en 1990 (Morin y cols., 1990). Afecta a animales entre los 15 días y los 4 meses, siendo más frecuentes entre la 4 y 10 semanas de edad. Caracterizada clínicamente por la aparición de fiebre, disnea y tos con una morbilidad y mortalidad variable, observándose adelgazamiento en los animales supervivientes (Morin y cols., 1990; Szeredi y Szentirmai, 2008).

Las lesiones macroscópicas en el parénquima pulmonar se caracterizan por un aumento en la coloración pálida-rojiza, especialmente en la parte craneal de los pulmones, pérdida de colapso así como aumento de la consistencia, edema en los septos y aumento de tamaño e hiperemia de los linfonodos mediastínicos (Szeredi y Szentirmai, 2008; Cheng y cols., 2011), observándose en ocasiones fibrosis pulmonar crónica con hepatización gris del parénquima de distribución desigual (Szeredi y Szentirmai, 2008; Cheng y cols., 2011).

Microscópicamente, se describe infiltrado inflamatorio mononuclear linfohistiocítico en paredes alveolares con hiperplasia de neumocitos tipo II. Otras lesiones que también pueden encontrarse son membranas hialinas, macrófagos y células gigantes multinucleadas, así como bronquiolitis obliterante con proliferación de miofibroblastos y deposición de colágeno extracelular con importante obstrucción de la luz de bronquiolos y alveolos por la presencia de grupos celulares necróticos en los casos crónicos, dando lugar a una neumonía necrótico-proliferativa (Morin y cols., 1990; Larochelle R, 1994;Drolet y cols., 2003; Szeredi y Szentirmai, 2008; Cheng y cols., 2011).

El papel que el PCV2 juega en la PNP es contradictorio. Inicialmente se describió la PNP asociada a una nueva cepa de SIv (Girard y cols., 1992). Posteriormente, se aisló de manera repetida PRRSv a partir de lesiones de PNP en ausencia de SIV, por lo que el PRRSv fue propuesto como el principal agente de dicha patología (Larochelle R, 1994). Fue a finales de los años 90, cuando algunos autores sugirieron la posible participación del PCV2 en la PNP (Ellis y cols., 1999a). Sin embargo, Drolet y cols., en 2003 en Canadá sugiere que el PRRSv es el principal causante de la PNP, descartando al PCV2 como agente importante en su desarrollo, basándose en que en los casos estudiados nunca se detectó PCV2 como agente único. Otros estudios indicaron que la PNP era el resultado de la coinfección de PRRSv y PCV2 (Pesch y cols., 2000; Quintana y cols., 2001; Grau-Roma y Segalés, 2007; Morandi y cols., 2010). Si bien, en Europa señalan al PCV2 como principal agente etiológico de la PNP describiendo casos en los que solamente ha sido posible demostrar la presencia de PCV2 (Szeredi y Szentirmai, 2008), en el estudio realizado por Morandi y cols., en 2010, en Italia, el PRRSv estuvo más asociado a las lesiones de PNP que el PCV2, aunque la coinfección con ambos virus parecía incrementar la severidad de la enfermedad.

- ✓ ***Enteritis asociada a PCV2***

La enteritis por PCV2 afecta a cerdos entre las 6-16 semanas y son cada vez más frecuentes (Kim y cols., 2004b; Chae, 2005; Opriessnig y cols., 2007). Presenta una clínica y lesiones similar a la ileitis asociada a Lawsonia intracellularis.

Las lesiones macroscópicas observadas con mayor frecuencia son engrosamiento de la mucosa intestinal y aumento de tamaño de los linfonodos mesentéricos (Jensen y cols., 2006). Microscópicamente, se puede observar enteritis granulomatosa con infiltrado linfohistiocítico transmural, atrofia de vellosidades y desprendimiento y/o regeneración de las células epiteliales de las glándulas y criptas. Estas lesiones se asocian a abundantes Ags de PCV2, localizados en las células epiteliales de la mucosa afectada y en células monocito-macrofágicas en la mucosa, submucosa, túnica muscular, subserosa, vasos linfáticos y tejido linfoide asociado. Las placas de Peyer presentan las lesiones histológicas características de las enfermedades asociadas a PCV2 (Allan y Ellis, 2000; Jensen y cols., 2006).

Se han descrito casos de enteritis asociada a PCV2 en animales postdestete mediante histopatología, aislamiento de PCV2 y detección antigénica mediante ISH, pero sin observar depleción linfoide ni histiocitosis en los folículos linfoides en una granja aparentemente libre de PMWS y PDNS, por lo que se propuso que el diagnóstico de enteritis asociada a PCV2 se caracterizara solamente por, 1) sintomatología de diarrea, 2) lesiones linfoides características presentes únicamente en las placas de Peyer, pero no en otros linfonodos, y 3) Ag o ácido nucleico de PCV2 presente en las lesiones (Kim y cols., 2004b).

- ✓ ***Fallo reproductivo por PCV2***

Numerosos trabajos han descrito fallos reproductivos asociados a PCV2 (West y cols., 1999; Ladekjaer-Mikkelsen y cols., 2001; O`Connor y cols., 2001). Las manifestaciones clínicas en las explotaciones afectadas incluyen abortos, nacidos muertos (West y cols., 1999; Brunborg y cols., 2007), momificaciones fetales (Madson y cols., 2009), y un aumento de la mortalidad predestete, afectando principalmentes a cerdas primerizas o de nueva introducción en donde el número de hembras es elevado o en explotaciones seronegativas frente a PCV2 (West y cols., 1999; Opriessnig y cols., 2007; Togashi y cols., 2011).

Los neonatos nacidos muertos o no viables presentan congestión pasiva crónica hepática e hipertrofia cardiaca con áreas multifocales de decoloración del miocardio (West y cols., 1999; O´Connor y cols., 2001), ascitis, hidrotórax e hidropericardio.

La lesión microscópica típica en los nacidos muertos o neonatos en infecciones naturales es una miocarditis que puede variar de no supurativa a necrotizante o fibrótica asociada a moderada-abundante cantidad de Ag o genoma de PCV2 (West y cols., 1999; O´Connor y cols., 2001; Mikami y cols., 2005). Otras lesiones descritas han sido congestión pasiva crónica hepática, vasculitis y neumonía moderada en fetos (Segalés, 2012; Szeredi y cols., 2015).

Mediante infección experimental intrauterina de fetos inoculados con PCV2 a los 57, 75, y 92 días de gestación, se confirmó que el corazón es el lugar primario de replicación del PCV2, siendo la replicación del virus significativamente mayor en los fetos inoculados a los 57 días de gestación. Todos los fetos fueron sacrificados a los 21 días postinoculación, observándose lesiones macroscópicas de edema, congestion, hemorragias y hepatomegalia, en los fetos que habían sido inoculados a los 57 días de gestación (Sánchez y cols., 2001a).

En otro estudio, en el que se inocularon intramuscularmente fetos de cerdas gestantes a los 86, 92, y 93 días de gestación, se observó, en el momento del parto, el nacimiento de lechones normales, mortinatos, lechones débiles y momificados, confirmándose que PCV2 puede infectar fetos a término y causar alteraciones reproductivas (Johnson y cols., 2002).

Las células diana de PCV2 pueden ser desde cardiomiocitos, hepatocitos y macrófagos durante la vida fetal a solo macrófagos tras el nacimiento (Sánchez y cols., 2003). Sin embargo, no se sabe realmente si en los macrófagos se produce replicación viral de PCV2, o únicamente actúan como acumuladores de partículas víricas. También se ha sugerido, que los títulos altos de PCV2 en los órganos linfoides de fetos infectados de forma intrauterina podrían llevar al desarrollo de lesiones histológicas similares a aquellas observadas en cerdos con PCV2-SD/PMWS sin causar enfermedad (Sánchez y cols., 2004).

Se ha demostrado la transmisión transplacentaria del PCV2 mediante la inoculación experimental intranasal de reproductoras seronegativas a PCV2 tres semanas antes de la fecha prevista de parto. De estas cerdas, algunas abortaron y las otras parieron de forma prematura, detectándose ácido nucléico y Ags de PCV2 en tejido linfoide y no linfoide de los lechones nacidos vivos y mortinatos. Sin embargo, no se observaron lesiones microscópicas parecidas a las de PMWS en el tejido linfoide de los lechones nacidos, ni lesiones cardiacas en los fetos abortados ni en los mortinatos (Park y cols., 2005). Esto podría explicarse por el hecho de que la infección por PCV2 tuvo lugar al final de la gestación, dado que las alteraciones cardiacas macroscópicas han sido descritas cuando los fetos eran infectados a la mitad de la gestación (Sánchez y cols., 2001a).

Otro estudio experimental con inoculación intrauterina con semen infectado con PCV2, dio lugar a fallos reproductivos (mortinatos y fetos momificados) y viremia en las cerdas y lechones, detectándose Ags de PCV2 en miocardio de los lechones (Madson y cols., 2009).

Aunque existen numerosas descripciones experimentales que señalan al PCV2 como patógeno reproductivo, los datos de casos de campo sugieren que la mayoría de las explotaciones de reproducción son aparentemente inmunes, siendo los fallos reproductivos asociados a PCV2 relativamente raros (Opriessnig y cols., 2007).

- ✓ ***Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS)***

El síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS) puede afectar a cerdos en transición y en cebo y, esporádicamente, a animales adultos (Drolet y cols., 1999). Presenta una prevalencia en las explotaciones afectadas relativamente baja, siendo menor de un 1% (0,05-0,5%) (Segalés y cols., 1998). Sin embargo, se han descrito prevalencias mayores en el Reino Unido y otros países que oscilan entre 0,25 y 20% (Gresham y cols., 2000). La mortalidad en los cerdos afectados de entre 1,5 y 3 meses de edad, es de aproximadamente un 33%, mientras que en los cerdos de 3 meses de edad o mayores puede llegar al 100% (Segalés y cols., 1998).

Los cerdos con enfermedad aguda severa mueren a los pocos días del inicio de los signos clínicos (Drolet y cols., 1999). Los cerdos que superan la enfermedad tienden a recuperar su peso a los 7-10 días después del comienzo del síndrome (Segalés y cols., 1998).

Los signos clínicos incluyen anorexia, depresión, postración, andar rígido y/o reluctancia al movimiento, y temperatura normal o leve pirexia (Segalés y cols., 1998; Drolet y cols., 1999). En la fase aguda de la enfermedad el signo más obvio es la presencia de máculas y pápulas en piel con tendencia a coalescer. Con el tiempo, dichas lesiones se cubren por una costra oscura y desaparecen gradualmente, normalmente en 2-3 semanas, dejando en ocasiones cicatrices (Thibault y cols., 1998; Drolet y cols., 1999). La causa de la muerte en los cerdos afectados de PDNS es un fallo renal agudo (Smith y cols., 1993; Helie y cols., 1995; Segalés y cols., 1998), normalmente con un marcado aumento de los niveles de creatina y urea en suero (Drolet y cols., 1999).

Macroscópicamente, se observan máculas y pápulas de morfología irregular y color rojo a violáceo con centro negro, localizadas en las extremidades posteriores y zona perineal, aunque pueden tener una distribución generalizada en los animales afectados de manera más severa. Además, aparecen hemorragias subcutáneas y edema en las áreas afectadas. Otras lesiones son aumento de tamaño de los linfonodos, principalmente el inguinal superficial, costras en los animales que superan la fase aguda y

ocasionalmente se pueden observar infartos esplénicos (Segalés, 2012). Los cerdos que mueren de forma aguda con PDNS tienen ambos riñones aumentados de tamaño, de consistencia firme, con superficie cortical finamente granular y edema en pelvis renal. La corteza renal además presenta múltiples lesiones puntiformes rojizas y de pequeño tamaño, similares a hemorragias petequiales (Helie y cols., 1995; Ramos-Vara y cols 1997; Segalés y cols., 1998, Segalés, 2012).

Microscópicamente, la vasculitis necrotizante es una característica sistémica en este síndrome, dado que se pueden presentar en cualquier tejido, pero principalmente en piel, pelvis renal, mesenterio y bazo (Segalés y cols., 1998; Thibault y cols., 1998). En piel se observa necrosis multifocales asociadas a vasculitis necrotizante de los capilares y arteriolas de dermis e hipodermis, y amplias hemorragias (Helie y cols., 1995; Segalés y cols., 1998; Thibault y cols., 1998). A nivel renal se puede apreciar vasculitis generalizada y glomerulonefritis, indicativa de una reacción de hipersensibilidad tipo 3, caracterizada por el depósito de complejos Ag-Ac o inmunocomplejos en ciertos tejidos. Se observan los glomérulos aumentados de tamaño, con fibrina, células inflamatorias necróticas y eritrocitos dentro del espacio de Bowman, lo que define una glomerulitis fibrinonecrotizante. También se puede observar nefritis intersticial no purulenta, de moderada a severa, con dilatación de los túbulos renales y degeneración granular hialina del epitelio tubular. Los cerdos con un curso prolongado de la enfermedad pueden mostrar una glomerulonefritis crónica, probablemente como resultado de la progresión del daño glomerular inicial (Segalés y cols., 1998; Segalés, 2012). En los tejidos linfoides de los cerdos afectados por PDNS se observa depleción linfoide y cierto grado de infiltrado histiocítico y/o células gigantes multinucleadas (Ramos-Vara y cols., 1997; Segalés y cols., 1998; Thibault y cols., 1998; Rosell y cols., 2000b; Segalés, 2012). También se puede observar vasculitis necrotizante de arterias o arteriolas esplénicas (Wellenberg y cols., 2004b).

Muchos agentes patógenos víricos, incluidos PRRSv (Thibault y cols., 1998; Choi y Chae, 2001) y bacterianos (*P. multocida, Strept. suis tipo 1 y 2, E. coli, Proteus sp., H. parasuis,* App*, B. bronchiseptica, A. pyogenes, St. aureus* y *Salmonella spp.*) (Lainson y cols., 2002; Thomson y cols., 2002) se han descrito como posibles agentes etiológicos del PDNS.

La asociación del PCV2 con el PDNS fue descrita, por primera vez, en el 2000 (Rosell y cols., 2000b). El estudio de casos de PDNS observados en Irlanda del Norte en 1990, que en esa época era libre de PRRSv, demostró la presencia de Ag de PCV2 asociado con linfadenitis granulomatosa (Allan y cols., 2000). Un estudio demostró una asociación significativa entre títulos altos de Ac frente a PCV2 y el desarrollo de PDNS sugiriendo que la base patogénica causante del PDNS podría ser la presencia excesiva de niveles de Acs frente a PCV2. Aunque no se pudo demostrar la presencia de Ags de PCV2 mediante IHQ en todos los casos de PDNS, sí se confirmó, mediante PCR, la presencia de ADN de PCV2 en todos ellos, y la ausencia de ácido nucléico de PPv y PRRSv en muchos de los casos de PDNS (Wellenberg y cols., 2004). Otros autores también confirmaron la infección por PCV2 en cerdos con PDNS y además observaron que los casos de PDNS tenían una carga viral en suero de PCV2 significativamente menor que los cerdos con lesiones moderadas o severas de PMWS (Olvera y cols., 2004). Sin embargo, se ha conseguido reproducir experimentalmente el PDNS sin la participación de PCV2 (Krakowka y cols., 2008). Según estos autores, el PDNS sería la manifestación de una coagulación intravascular diseminada (CID), y representaría una coagulopatía sistémica de comienzo súbito que se expresaría clínicamente como microtrombosis de la vasculatura renal y de la dermis. Cualquier agente etiológico con tropismo por la piel y toxinas bacterianas activarían la cascada de la coagulación y podrían iniciar un CID, desencadenando un PDNS.

- ✓ ***Encefalitis y temblor congenito asociado a PCV2***

PCV2 ha sido asociado a sintomatología nerviosa que incluye apatía, ataxia, pedaleo, opistótonos, nistagmo y convulsiones (Correa y cols., 2007; Seeliger y cols., 2007).

Macroscópicamente, se observa principalmente petequias en leptomeninges y edema (Correa y cols., 2007), así como hiperemia y hemorragias tanto en meninges como en parénquima afectando a la materia gris y blanca del cerebelo (Bukovsky y cols., 2007; Seeliger y cols., 2007).

Las lesiones microscópicas observadas en cerebelo incluyen leptomeningitis, meningoencefalitis y encefalitis, caracterizadas por vasculitis necrotizante linfohistiocitica en arterias y venas de pequeño a mediano calibre, hipertrofia del endotelio, infiltrado linfohistiocítico perivascular con depósito de fibrina, degeneración y necrosis neuronal, espongiosis, apoptosis de células endoteliales y edema del neuropilo. Además se ha observado infiltrado linfohistiocítico y vasculitis en plexos coroideos, gliosis en médula oblongada, coroiditis linfohistiocítica, meningitis mononuclear asociada a infiltrado perivascular linfohistiocítico y vasculitis (Bukovsky y cols., 2007; Correa y cols., 2007; Seeliger y cols., 2007).

Mediante IHQ se ha detectado Ag de PCV2 en el núcleo y citoplasma de macrófagos perivasculares intralesionales, en citoplasma de células endoteliales de los vasos de pequeño y mediano calibre tanto en zonas afectadas como no afectadas del cerebelo, ocasionalmente en leucocitos intra y perivasculares y en células similares a fibroblastos (Allan y cols., 1999a; Kennedy y cols., 2000; Fenaux y cols., 2002; Correa y cols., 2007; Seeliger y cols., 2007). Mediante ISH se ha detectado el genoma de PCV2 en cerebelo en el citoplasma de las células endoteliales de los pequeños vasos afectados, y no afectados, y en leucocitos perivasculares; también en células endoteliales de las meninges y en la materia blanca de la médula espinal (Seeliger y cols., 2007). Otros autores también lo han detectado en células gliales, endoteliales y células con el fenotipo de macrófagos perivasculares y meníngeos o en macrófagos de meninges y perivasculares, en mesencéfalo, cerebelo y médula oblongada (Bukovsky y cols., 2007). Este tropismo endotelial del PCV2 detectado mediante ISH e IHQ, y la falta de inmunocomplejos detectables en los vasos afectados apunta directamente a un daño vascular del PCV2 (Seeliger y cols., 2007).

Recientemente, Drolet y cols., en 2011, han descrito una meningoencefalitis linfohistiocitica-granulomatosa multifocal con células gigantes multinucleadas asociada a PCV2 en dos cerdos en edad de sacrificio.

El temblor congénito (*congenital tremor,* CT) caracterizado por contracciones clónicas de diversa intensidad que decrecen con el tiempo hasta resolverse, está asociado con hipomielinogenesis o desmielinizacion del cerebro y medula espinal. El tipo A2 es el más común y se ha asociado a ADV o a infecciones virales sin identificar. La mortalidad en los cerdos afectados puede llegar hasta el 50%, debido a la incapacidad de los lechones para mamar (Kennedy y cols., 2003; Chae, 2005).

Algunos autores detectaron ácido nucleico y Ag de PCV2 en el encéfalo y médula espinal de animales con CT mediante ISH, inmunofluorescencia indirecta y PCR, principalmente en grandes neuronas y células de Purkinje. Aunque también se detectó en animales clínicamente sanos, la cantidad de células positivas fue mayor en los animales con CT. En ninguno de los dos grupos, afectados y clínicamente sanos, hubo lesiones macro ni microscópicas (Stevenson y cols., 2001).

Por otro lado, otros estudios no han podido detectar PCV2 en animales con CT (Kennedy y cols., 2003; Ha y cols., 2005). Por lo tanto, la asociación entre PCV2 y CT es, hoy en dia, controvertida y son necesarios más estudios para aclarar el papel del PCV2 en CT.

2.4.3.5 DIAGNÓSTICO

- ✓ ***Diagnóstico de PCVD***

El diagnóstico de PCVD a nivel de explotación tiene que tener en cuenta 1) el porcentaje de cerdos diagnosticados con PCVD de todos los remitidos y 2) un aumento de la mortalidad en la explotación estudiada. Por lo general, se considera al PCVD como un problema de explotación si se diagnostica PCVD en el 50% o más de los cerdos de una muestra representativa y si hay un aumento significativo de la mortalidad comparada con parámetros previos de la explotación. Se considera como PCVD esporádico si se diagnostica PCVD en menos del 50% de una muestra representativa**,** simultáneamente con un aumento de la mortalidad o si se diagnostica PCVD en más del 50% de una muestra representativa sin aumento de mortalidad de forma simultánea (Segalés, 2006).

Para diferenciar las distintas manifestaciones clínicas de PCVD es importante evaluar las lesiones histopatológicas y la presencia de PCV2 en intestinos, pulmones y tejidos linfoides (Segalés, 2012).

- ***Diagnóstico de enfermedades sistémicas asociadas a PCV2. PMWS***

Los criterios de diagnóstico de PMWS están muy bien definidos (Sorden, 2000; Segalés, 2002). Se considera que un cerdo o grupo de cerdos presentan PMWS si cumplen los siguientes criterios (Sorden, 2000):

- **Signos clínicos** que incluyan retraso del crecimiento y adelgazamiento, frecuentemente con disnea y aumento del tamaño de los linfonodos inguinales, y ocasionalmente ictericia.
- **Presencia de lesiones histológicas características en los tejidos linfoides** (depleción linfocitaria junto con inflamación granulomatosa-linfohistiocítica y presencia de cuerpos de inclusión en cierto número de cerdos afectados) y/o inflamación granulomatosa-linfohistiocítica en otros órganos (pulmón, hígado, riñón, intestino, páncreas, etc.).
- **Detección, de moderada a severa**, de PCV2 en las lesiones histopatológicas presentes en los tejidos linfoides y otros tejidos de los cerdos afectados.

Esta definición de caso no excluye la presencia concomitante de otras enfermedades o coinfecciones con PMWS. Esto también significa que ni los signos clínicos ni las lesiones macroscópicas observadas en cerdos sospechosos de estar afectados de PCVD son suficientes para diagnosticar la enfermedad, aunque si son indicativas. Sin embargo, la presencia de signos clínicos, lesiones macroscópicas compatibles con PCVD y la demostración de elevada cantidad de PCV2 por diferentes métodos (inmunocitoquímica, captura cuantitativa de antígenos o ELISA de captura o PCR cuantitativa) pueden ser consideradas diagnósticas en ausencia de acceso a un estudio histopatológico (Segalés y cols., 2005a).

- ***Diagnóstico de enteritis asociada a PCV2***

El diagnóstico de enteritis asociada a PCV2 se caracteriza solo:

- si hay diarrea.
- si las lesiones características están presentes en las placas de Peyer pero no en otros linfonodos.
- si el antígeno o ácido nucleico de PCV2 está presente en las lesiones.

Estos tres criterios por separado no son diagnósticos de enteritis asociada a PCV2 (Kim y cols., 2004a).

- ***Diagnóstico de fallo reproductivo asociado a PCV2***

La definición de caso para los problemas reproductivos asociados con la infección por PCV2 no ha sido establecida formalmente, pero teniendo en cuenta las características clínico-patológicas de los casos descritos (West y cols., 1999; O´Connor y cols., 2001; Brunborg y cols., 2007; Pittman, 2008), debería incluir tres criterios principales:

- Abortos tardíos o a término y nacidos muertos, en ocasiones con una hipertrofia evidente del corazón de los fetos.
- Presencia de lesiones cardiacas caracterizadas por una extensa miocarditis necrótica y/o fibrosa.
- Presencia de gran cantidad de PCV2 en las lesiones miocárdicas y en otros tejidos fetales.

- ***Diagnóstico de PDNS***

La definición de caso de PDNS es relativamente sencilla (Smith y cols., 1993; Helie y cols., 1995):

- Presencia de lesiones necrotizantes y hemorrágicas en piel, localizadas principalmente en las extremidades posteriores y área perineal, y/o riñones pálidos y aumentados de tamaño, con petequias corticales generalizadas.
- Presencia de vasculitis necrotizante sistémica, y de glomerulonefritis fibrinosa y necrotizante.

Desde el punto de vista diagnóstico, actualmente, la detección de PCV2 no esta incluida dentro de los criterios diagnósticos para el PDNS.

✓ ***Diagnóstico diferencial***

La lista de diagnósticos diferenciales para PCV2-SD/PMWS puede ser muy amplia dependiendo del signo clínico dominante en cada explotación. La primera y más importante entidad a incluir en esta lista es la forma respiratoria del PRRS. Sin embargo, la amplia distribución del PRRSv en la mayoría de los países hace que la diferenciación entre PMWS y PRRS sea muy difícil, a no ser que se use una adecuada batería de tests laboratoriales para PRRSv y PCV2 al mismo tiempo.

Además, toda enfermedad que cause adelgazamiento debe ser incluida en la lista de diagnósticos diferenciales (Harding y Clark, 1997). Aparte del PRRS, deberían ser incluidas condiciones como PRDC, enfermedad de Glässer, peste porcina clásica (PPC), ADV, enfermedad del ojo azul (infección por Rubulavirus porcino), toxicidad por carbadox/olaquindox, colibacilosis postdestete, disenteria porcina, espiroquetosis colónica porcina, enteropatia proliferativa porcina, ulceración gástrica en la pars oesophagea, y eperitrozoonosis , dependiendo del país de origen (Segalés y cols., 2005a).

Para el PDNS, se deben incluir aquellas enfermedades que causen una coloración de la piel de roja a roja oscura (peste porcina africana y clásica, erisipelas, salmonelosis septicémica, infección por *Actinobacillus suis*, síndrome de estrés porcino, viruela porcina, epidermitis exudativa, sarna sarcóptica, dermatofitosis, pitiriasis rosada y otras septicemias bacterianas), así como aquellas que causen hemorragias petequiales en los riñones como la peste porcina clasica/africana y salmonelosis septicémica (Segalés, 2002; Thomson y cols., 2002). Se debe hacer especial énfasis en diferenciar el PDNS de la peste porcina clasica en Europa y de la salmonelosis septicémica en Norte America (Segalés, 2002).

La forma reproductiva asociada con el PCV2 puede ser indistinguible clínicamente de otras enfermedades porcinas que causen abortos tardíos o a término y nacidos muertos tales como PRRSv, ADV, PPV, influenza porcina, enfermedad del ojo azul, infecciones por enterovirus, virus de la encefalomiocarditis, peste porcina clásica, erisipelas y leptospirosis, entre otras (Segalés y cols., 2005a; Hansen y cols., 2010a).

- ✓ ***Diagnóstico laboratorial***

Generalmente, el diagnóstico de las enfermedades virales en el cerdo se basa en la detección del virus mediante cultivo, PCR, IHQ, ISH y/o detección de Acs mediante serología. Sin embargo, es habitual encontrar PCV2 en grupos de cerdos sanos (Allan y Ellis, 2000; Kim y cols., 2001; Calsamiglia y cols., 2002), de manera que la detección de éste no confirma necesariamente el diagnóstico de PMWS.

Para establecer un diagnostico etiológico, es necesario la realización de técnicas que demuestren la presencia del virus en las lesiones tisulares. Así, se han desarrollado numerosos métodos para la detección de PCV2 en tejidos, correlacionándolos con la presencia de lesiones.

Entre ellos, ISH y la IHQ son los tests empleados con mayor frecuencia (McNeilly y cols., 1999; Rosell y cols., 1999) para el diagnóstico de PCVAD. La detección de PCV2 implica infección por este agente, pero no necesariamente la presentación clínica de PWMS.

El material genético de PCV2 o Ags se ha identificado y descrito en el citoplasma de los histiocitos, células gigantes multinucleadas y otros monocitos o células de la línea macrofágica como los macrófagos alveolares, las células de Kupffer y células dendríticas del tejido linfoide (Rosell y cols., 1999; Allan y Ellis, 2000; Rosell y cols., 2000b). También se ha detectado en el citoplasma de las células de los epitelios renal y respiratorio, endotelio vascular, células de los acinos pancreáticos y en los núcleos de los monocitos, células de la musculatura lisa, hepatocitos y enterocitos (Kiupel y cols., 1999; McNeilly y cols., 1999; Rosell y cols., 1999; Rosell y cols., 2000b; Sirinarumitr y cols., 2000) e incluso en el endotelio vascular a nivel del sistema nervioso central (Correa, 2007).

Particularmente la PCR se puede emplear como técnica complementaria en la detección de PCV2 en aquellos tejidos que presenten lesiones histológicas descritas en PWMS (Kim y Chae, 2001, 2003).

Existen numerosos ensayos de PCR descritos para la detección de ácido nucleico específico de PCV2 (Morozov y cols., 1998; Hamel y cols., 2000; Larochelle y cols., 2000; Shibata y cols., 2003; Grierson y cols., 2004), habiéndose desarrollado numerosas variantes de la técnica convencional (PCR Multiplex, Anidada, Multiplex anidada, cuantitativa a tiempo real y transcriptasa inversa).

Los estudios serológicos, técnicas de diagnóstico indirectas, son de gran utilidad para evaluar la dinámica de los Acs, así como la interferencia de los Acs maternales en la monitorización de planes de vacunación (Rodríguez-Arrioja y cols., 2000; Brunborg y cols., 2010; Podgórska y cols., 2011; Fablet y cols., 2012; Segalés, 2012). Para la detección de Acs anti-PCV2 se han desarrollado varias técnicas serológicas. Los más utilizados se basan en cultivo de células infectadas con PCV2 (IPMA/Inmunofluorescencia indirecta) o técnicas ELISA (placas antigenadas por PCV2 o baculovirus que expresan en su cápside proteínas de PCV2) (Walker y cols., 2000; Nawagitgul y cols., 2002; Blanchard y cols., 2003; McNair y cols., 2004) . Estas técnicas deben emplearse de forma conjunta ya que éste es un virus ubicuo y pueden obtenerse resultados positivos en ausencia de enfermedad clínica (Brunborg y cols., 2004; Turner y cols., 2009; Podgórska y Stadejek, 2011).

Actualmente existe un kit de ELISA IgG e IgM para PCV2 que permite comparar los valores de IgG e IgM determinando la dinámica de la infección: valores de IgM superiores o iguales a los valores de IgG (inicio de una infección activa en los primeros 21 días postinoculación); valores de IgM inferiores a los de IgG (infección activa ya establecida aproximadamente entre los días 20-50 postinoculación), y por último, valores elevados de IgG y negativo para IgM (animales convaleciente en los que se resuelve la infección aproximadamente 2 meses después de la infección) (Segalés y cols., 2005b).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado desglosaremos el material y métodos empleados para el desarrollo de los objetivos específicos de la presente tesis, teniendo en cuenta que se podrán desarrollar los mismos métodos en más de un objetivo. Se pretende conocer en el desarrollo de las enfermedades respiratorias en el CNC estudiando:

1. Las causas de muerte de los ejemplares que fueron remitidos desde 2007 a 2012 al Servicio de diagnóstico anatomopatalógico de la Facultad de Veterinaria mediante estudio macroscópico e histopatológico de las lesiones observadas. Se identificó aquellos animales que sufrieron algún proceso respiratorio, intentando determinar la participación de distintos agentes bacterianos y víricos involucrados en el desarrollo del PRDC (Mh, PRRSv y PCV2) mediante la realización de técnicas inmunohistoquímicas (IHQ).
2. La presencia de lesiones en pulmones y otros órganos en ejemplares sanos enviados al Matadero Insular del Cabildo de Gran Canaria, estableciendo la participación de Mh, PRRSv y PCV2 en el desarrollo de las lesiones mediante la realización de técnicas de IHQ.
3. El contacto con estos agentes patógenos y el desarrollo de inmunidad en los ejemplares presentes en distintas explotaciones localizadas en el Archipiélago Canario, mediante la realización de técnicas serológicas, analizando además la viabilidad de los extractos pulmonares como muestras en técnicas de ELISA comerciales.

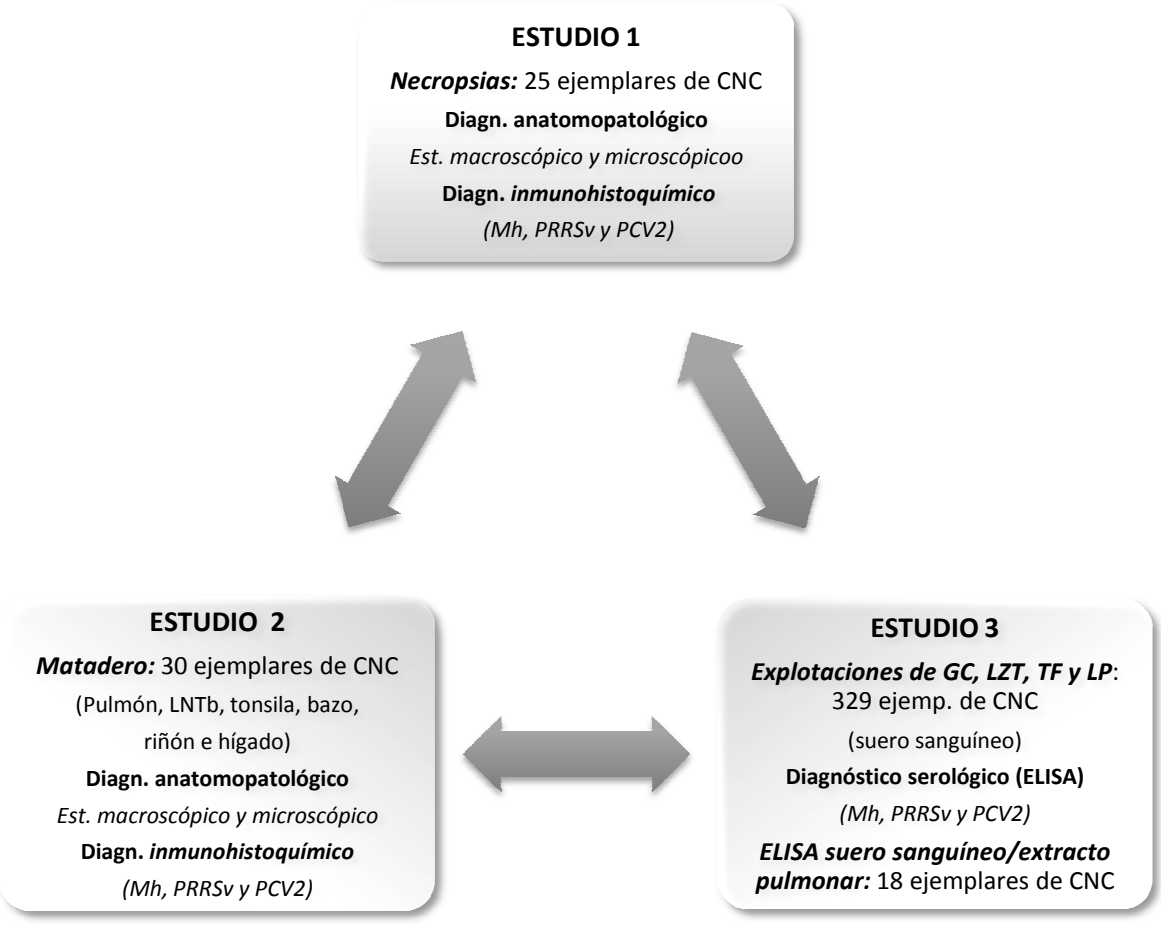


Ilustración 9: Esquema resumen del material y métodos empleados para el desarrollo de los objetivos planteados.

3.1 MATERIAL

3.1.1 ANIMALES OBJETO DE ESTUDIO

3.1.1.1 ESTUDIO 1.

Se realizó necropsia a 25 ejemplares muertos en distintas explotaciones de la isla de Gran Canaria y en una explotación de Lanzarote durante el periodo comprendido entre febrero de 2007 y enero de 2012.

Las necropsias se realizaron en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

En la siguiente tabla se recoge la información (procedencia, año de necropsia, sexo y edad) correspondiente a los animales a los cuales se les realizó necropsia. Según la edad, los animales se clasificaron en 3 categorías: lechones, animales de cebo y reproductores.

Tabla 8: Animales muertos durante el periodo de estudio (2007-2012). ***ID*** número de identificación, *Nº* número del caso, *Exp.* Explotación de procedencia, año de la muerte, sexo (♂,♀), edad de los animales y *Cat.* categoría de edad (*L* lechón, *C* cebo y *R* reproductor).

ID	Nº	EXP.	AÑO	SEXO	EDAD	CAT.
N1	76/07	GC13	2007	♀	2,5 meses	L
N2	77/07	GC13	2007	♀	2,5 meses	L
N3	230/07	GC6	2007	♀	>1 año (13 meses)	R
N4	397/07	GC12	2007	♂	1,5-2 meses	L
N5	625/07	GC12	2007	♂	7 meses	C
N6	475/08	GC12	2008	♀	2,5 meses	L
N7	481/08	GC12	2008	♂	1,5-2 meses	L
N8	487/08	GC5	2008	♀	1,5 meses	L
N9	635/08	GC12	2008	♀	1,5-2 meses	L
N10	671/08	GC6	2008	♀	2,5 meses	L
N11	672/08	GC6	2008	♀	2,5 meses	L
N12	673/08	GC6	2008	♂	2,5 meses	L
N13	008/09	GC6	2009	♂	>1 año	R
N14	131/09	GC6	2009	♂	>1 año	R
N15	208/09	LZT8	2009	♀	1 mes	L
N16	265/09	GC3	2009	♂	1,5-2 meses	L
N17	I 55/10	GC9	2010	♀	1,5 meses	L
N18	I 60/10	GC9	2010	♀	1,5-2 meses	L
N19	535/10	GC6	2010	♂	>1 año	R
N20	I 90/11	GC6	2011	♂	4 meses	C
N21	534/11	GC9	2011	♀	>1 año (15 meses)	R
N22	596/11	GC11	2011	♂	2-3,5 meses	L
N23	597/11	GC11	2011	♂	2-3,5 meses	L
N24	I 373/11	GC9	2011	♀	>1 año (15 meses)	R
N25	I 17/12	GC9	2012	♀	>1 año (4 años)	R

3.1.1.2 ESTUDIO 2:

Se inspeccionaron en el Matadero Insular del Cabildo de Gran Canaria un total de 30 animales procedentes de una explotación ubicada en el municipio de la Vega de San Mateo, pertenecientes a las categorías de reproductores (5), cebo (15) y lechones (10).

Se tomaron muestras de pulmón, linfonodo traqueobronquial (LNTb), tonsila, bazo, riñón e hígado en reproductores y animales de cebo, y de pulmón, LNTb, riñón e hígado en lechones. Los órganos muestreados fueron aquellos por los cuales tienen tropismo los agentes etiológicos involucrados en el desarrollo de PRDC y que son objeto de estudio (Segalés, 2012; Zimmerman y cols., 2012).

3.1.1.3 ESTUDIO 3:

- ✓ ***Seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 en la población de CNC.***

Se seleccionaron un total de 329 ejemplares de CNC, reproductores presentes en explotaciones ubicadas en Gran Canaria, Lanzarote, Tenerife y La Palma y lechones y animales de cebo presentes en las explotaciones de Gran Canaria.

Estos ejemplares debían cumplir con 2 criterios de selección:

1. Los reproductores debían estar incluidos en el libro fundacional del Libro Genealógico (LG) de la raza.
2. Los lechones y animales de cebo, debían ser descendientes de los primeros y cumplir con el estándar racial establecido por la normativa, aunque no estuvieran aún incluidos en el LG.

En ninguna explotación se seguía plan de vacunación que incluyera vacuna frente a Mh, PRRSv ni PCV2, asumiendo por tanto que cualquier resultado positivo obtenido durante el estudio serológico es debido a la presencia de Acs generados después del contacto con el agente patógeno o de una infección.

En la provincia de las Palmas se muestreó un total de 270 ejemplares; 228 en Gran Canaria distribuidos en 10 explotaciones, y 42 en Lanzarote distribuidos 8 explotaciones. En la provincia de Santa Cruz se muestreó un total de 59 ejemplares, 41 en Tenerife de 11 explotaciones distintas, y 18 en La Palma distribuidos en 6 explotaciones. En Gran canaria se muestrearon ejemplares de distintas categorías quedando representadas por 92 reproductores, 82 lechones y 54 animales de cebo. En el resto de las islas todos fueron reproductores (Tabla 9).

Además, se realizó una segunda serología en 5 de las 10 explotaciones de Gran Canaria analizadas inicialmente, a un total de 31 ejemplares reproductores. El tiempo transcurrido entre ambas serologías superó los 4 meses en 2 de las 5 explotaciones y fue inferior a 2 meses en las 3 explotaciones restantes.

Tabla 9. Explotaciones y número de animales por explotación en los cuales se realizó serología transversal y longitudinal. *Explotaciones en las que se realizó la segunda serología (serología longitudinal). **Tiempo aproximado transcurrido entre ambas serologías.

PROVINCIA (ISLA)	EXPLOTACIÓN	SEROLOGÍA TRANSVERSAL	SEROLOGÍA LONGITUDINAL
Las Palmas			
Gran Canaria	GC1	6	---
	GC2*	17	5 (4 meses)**
	GC3*	54	13 (4 meses)**
	GC4	11	---
	GC5*	100	5 (2 meses)**
	GC6*	21	6 (2 meses)**
	GC7	13	---
	GC8	2	---
	GC9	2	---
	GC10*	2	2 (2 meses)**
Lanzarote	LZT1	1	---
	LZT2	1	---
	LZT3	10	---
	LZT4	18	---
	LZT5	2	---
	LZT6	3	---
	LZT7	3	---
	LZT8	4	---
Santa Cruz			
Tenerife	TF1	1	---
	TF2	3	---
	TF3	1	---
	TF4	5	---
	TF5	10	---
	TF6	5	---
	TF7	4	---
	TF8	3	---
	TF9	3	---
	TF10	2	---
	TF11	4	---
La Palma	LP1	8	---
	LP2	2	---
	LP3	1	---
	LP4	2	---
	LP5	1	---
	LP6	4	---

3.1.1.4 EXTRACTOS DE TEJIDO PULMONAR PARA REALIZACIÓN DE TÉCNICAS DE ELISA.

De un total de 18 animales, sacrificados en matadero, se tomaron muestras de sangre, en vacutainers sin anticoagulante, en el momento de la exanguinación y muestras de pulmón, que fueron almacenadas en bolsas plásticas estériles. Estas muestras fueron conservadas a -80ºC.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO: DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO MACROSCÓPICO

3.2.1.1 ESTUDIO 1

Se realizó necropsia sistemática completa siguiendo el protocolo propuesto por King y cols. (1989) a los ejemplares de CNC remitidos al Servicio de diagnóstico anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria. Durante el desarrollo de la misma, se describieron las lesiones macroscópicas observadas y se estableció un diagnóstico morfológico de las lesiones. Para realizar el estudio histopatológico, se tomaron muestras de los distintos órganos y tejidos, tanto de los órganos con lesiones macroscópicas como de los aparentemente normales y se fijaron en formol tamponado al 10%, durante al menos 24h, para su posterior inclusión en parafina y tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E).

*En este **estudio** únicamente se presentarán los resultados obtenidos de aquellos casos donde se observó algún tipo de lesión macroscópica y diagnóstico morfológico a nivel del **sistema respiratorio asociadas a procesos inflamatorios**. Teniendo en cuenta 3 aspectos: 1) los procesos inflamatorios a nivel respiratorio tienen una elevada repercusión en la producción porcina; 2) se corresponde con la línea de investigación seguida en esta tesis y 3) da respuesta al objetivo genérico de la misma.*

- **Técnica de necropsia**

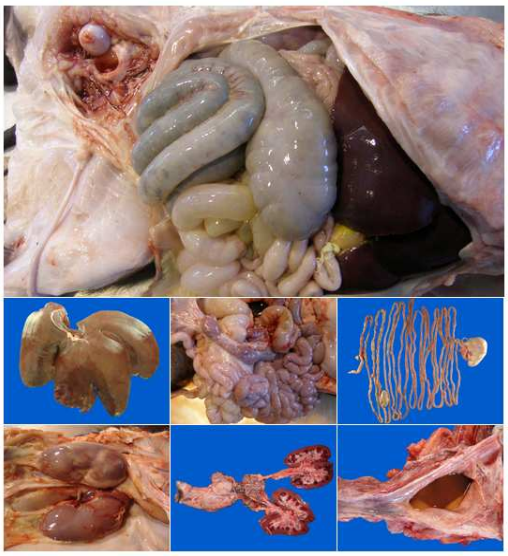
De manera resumida, las necropsias se llevaron a cabo siguiendo los pasos que se enumeran a continuación:

1. Colocar el cadáver en decúbito lateral izquierdo, realizar inspección externa (piel y mucosas) y estabilizar mediante la desarticulación de las extremidades torácica y pelviana derecha.

2. Inspección del aparato locomotor (articulación escápulohumeral, coxofemoral y femorotibiorrotuliana, y músculos de las extremidades torácicas y pelvianas).

3. Retirar piel de cavidad torácica y pelviana desde línea media hacia columna vertebral e inspeccionar tejido subcutáneo y LNs superficiales (preescapulares, poplíteo, inguinal superficial, etc…)

4. Apertura de la cavidad abdominal, mediante insición de músculos de la pared abdominal siguiendo una línea curva trazada a nivel de las últimas costillas desde las vértebras torácicas hasta el cartílago xifoides del esternón, siguiendo por línea alba en dirección caudal hasta el pubis y en dirección dorsal hacia las vértebras lumbosacras y evaluar localización anatómica normal de los órganos de la cavidad abdominal.



5. Realizar inspección y toma de muestras de órganos de cavidad abdominal (hígado, bazo, estómago, páncreas, intestino delgado y grueso, linfonodos mesentéricos, glándulas adrenales, riñones, uréteres y vejiga urinaria).

6. Incisión en diafragma para comprobar presión negativa de la cavidad torácica. Separar diafragma del arco costal.

7. Apertura de la cavidad torácica, cortando las costillas en el punto de unión costoesternal y costovertebral y evaluar localización anatómica normal de los órganos de la cavidad torácica.

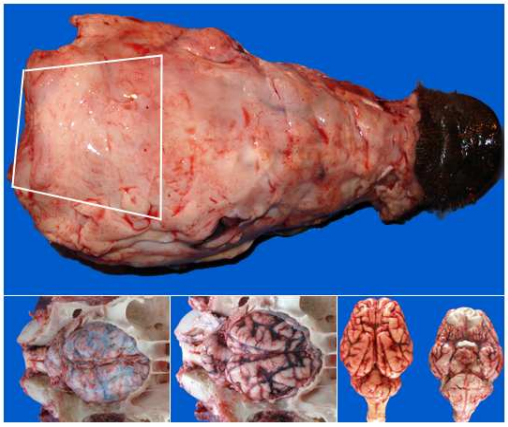
8. Apertura de saco pericárdico evaluando la presencia de líquido.

9. Realizar inspección y toma de muestra de los órganos de la cavidad torácica (sistema respiratorio, cardiaco, linfonodos mediastínicos y timo).

10. Apertura de la cavidad pelviana cortando a nivel del agujero obturado a ambos lados de la sínfisis púbica e inspección y toma de muestra de los órganos genitales.

11. Separación de la cabeza del cadáver, mediante la realización de una incisión ventral en la articulación atlantooccipital.

12. Apertura de la cavidad craneana mediante la realización de un corte coronal sobre el techo del cráneo, a la altura del ángulo lateral del ojo, y dos cortes laterales por encima de los cóndilos del occipital y dirigidos hacia los extremos del corte coronal, levantando finalmente la tapa del cráneo y separando la duramadre.



13. Inspección y toma de muestra del SNC e hipófisis.

Durante la realización de la necropsia se fue documentando los hallazgos macroscópicos con la realización de fotografías y la cumplimentación de un informe de necropsias, como el que se expone a continuación:

CENTRO:

Nombre del Veterinario:
Tfno: Fax:
E-mail:
Dirección:

Especie: Raza:
Sexo: M / H (Gestante: Sí / No)
Castrado: Sí / No
Edad: Estado nutricional: 1 / 2 / 3 / 4 / 5
Fecha de Fallecimiento: Grados de putrefacción: 0 / 1 / 2 / 3
Eutanasia: Sí / No Método de Conservación:
Fecha de necropsia:

INFORME DE NECROPSIA

a rellenar en recepción
Número de Registro:

Fecha de Recepción: _____

Número de Historial HCV: _____

Ref. Animal:

DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO

TEGUMENTO (Piel, mucosas, subcutáneo):
CAVIDADES (Abdominal, torácica, saco pericárdico):
HÍGADO:
Cara Parietal:
Cara visceral:
Vesícula biliar:
Ganglio hepático:
BAZO:
SISTEMA DIGESTIVO:
Boca:
Esófago:
Preestómagos / Estómago:
Páncreas:
Intestino Delgado:
- Duodeno:
- Yeyuno:
- Ileon:
- Ganglios mesentéricos

Intestino Grueso:
- Válvula ileocecal:
- Ganglio ileocecal:
- Ciego:
- Ganglios cecales
- Colon:
- Recto:

SISTEMA URINARIO (Riñones, uréteres, vejiga, uretra):
GLÁNDULAS ENDOCRINAS (Adrenales, tiroides, hipófisis):
SISTEMA GENITAL
Genital masculino: Escroto, Testículos, Pene, Glándulas anexas (Próstata, Seminales, Bulbouretrales)
Genital femenino: Ovarios, útero, vagina, placenta.
Glándulas mamarias:
SISTEMA CIRCULATORIO (Corazón, vasos, sangre)
SISTEMA RESPIRATORIO (Faringe, laringe, tráquea y pulmones; ganglios retrofaríngeos, traqueobronquial; mediastínicos):
LINFONODOS Explorables palpables y no palpables (Inguinales superficiales, profundos, prefemorales, poplíteos, preescapular):
MÚSCULOS, HUESOS Y ARTICULACIONES:
SISTEMA NERVIOSO (Médula espinal, tronco del encéfalo, cerebelo, cerebro):
ÓRGANOS DE LOS SENTIDOS:

FOTOS

OBSERVACIONES

MUESTRAS RECOGIDAS

ÓRGANO	HISTOLOGÍA Formol tamponado (10%)	MICROBIOLOGÍA (-20 o -80ºC)	TOXICOLOGÍA (-20 o -80ºC)
Piel			
Músculo esquelético			
LN preescapular			
Glándula mamaria			
LN inguinal sup.			
LN prefemorales			
LN poplíteos			
Hígado			
Bazo			
Preestómagos			
Estómago			
Páncreas			
Intestino			
LN mesentéricos			
LN inguinal prof.			
Glándulas adrenales			
Riñón			
Vejiga urinaria			
Ovario			
Útero			
Placenta			
Testículo			
Próstata			
Tonsila			
LN retrofaríngeo			
Tiroides			
Esófago			
Tráquea			
Pulmón			
LN mediastínico			
Corazón			
Encéfalo			
Médula espinal			
Hipófisis			
Médula ósea			
Ojo			
Contenido gástrico			
Líquido cefalorraquídeo			
Sangre y/o suero			
Orina			
Leche			
Heces			

Parasitología:

ANEXO TÉCNICO

Fecha tallado:

Responsable:

Identificación de los bloques histológicos:

- ✓ ***Estudio 2.***

En matadero se tomaron muestras de pulmón, LNTb, tonsila, bazo, hígado y riñón después de su examen macroscópico mediante inspección visual, palpación e incisión del parénquima. De pulmón se tomaron entre 3 y 4 muestras (con y sin lesiones), quedando representados los lóbulos craneal, medio y caudal, priorizando el lado derecho (Maes, 1996; Sorensen, 1997).

Estas muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10% a temperatura ambiente durante 24h para su posterior tallado e inclusión en parafina.

3.2.2 DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO: DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO MICROSCÓPICO

- ✓ ***Estudio 1 y 2.***

Las muestras fijadas en formol después de la realización de las necropsias del **estudio 1** y de la inspección en matadero del **estudio 2** fueron talladas y deshidratadas mediante una escala ascendente de alcoholes y aclaradas en xilol en un procesador automático de tejidos (Leica, TP-1050)[1]. A continuación, las muestras se incluyeron en parafina en un dispensador de parafina (Leica, EG-1160)[1] para la realización de los bloques, los cuales fueron cortados a 5 µm de grosor en un micrótomo (Leica, RM-2135)[1], para su posterior tinción mediante la técnica de rutina de H&E siguiendo el protocolo descrito a continuación:

PROTOCOLO DE DESPARAFINADO

- Incubación de los cristales a 100ºC durante 30 minutos, favoreciendo la adhesión de tejido al portaobjetos y la fusión de la parafina circundante.
- 2 pases de 2 minutos por xilol.
- 2 pases de 2 minutos por alcohol de 100º.
- 1 pase de 2 minutos por alcohol de 70º.
- 3 pases de 2 minutos por agua destilada.

BATERÍA DE TINCIÓN

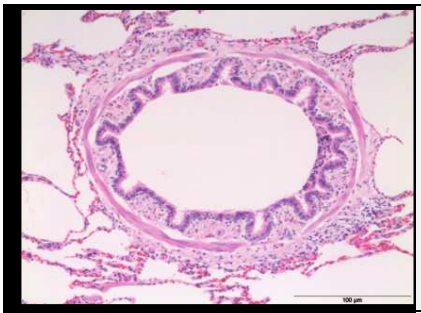
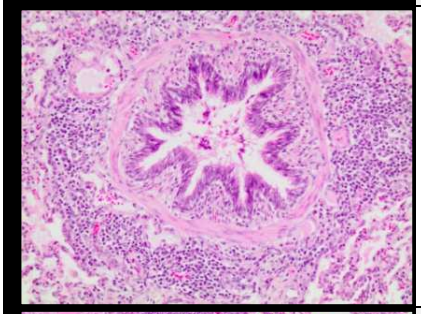
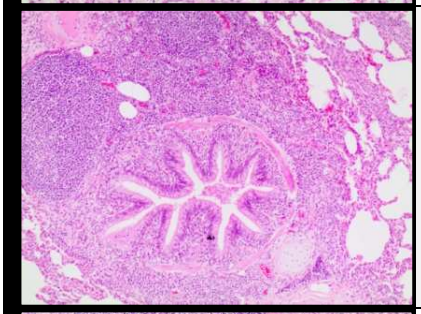
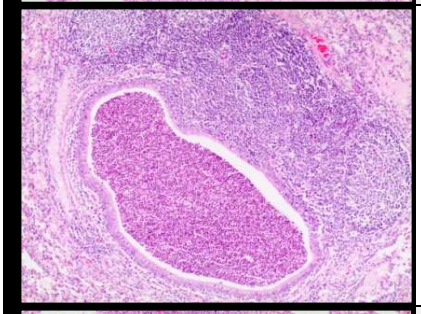
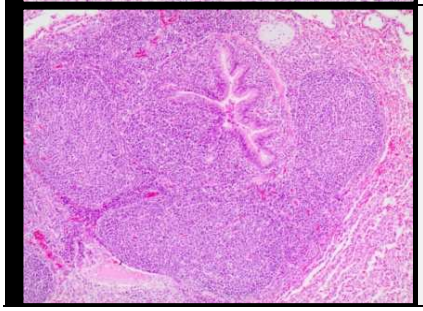
- Hematoxilina de Harris durante 15 minutos.
- Aclarado en agua corriente.
- 4 pases rápidos por alcohol clorhídrico.
- Aclarado en agua corriente.
- 15 pases rápidos por agua amoniacal.
- Lavado en agua corriente durante 15 minutos.
- Eosina durante 4 minutos.
- 2 pases de 2 minutos por alcohol de 96º.
- 2 pases de 2 minutos por alcohol de 100º.
- 3 pases de 2 minutos por xilol.
- Montaje con resina DPX.

Los distintos cortes histológicos fueron evaluados sistemáticamente. A nivel pulmonar, se examinaron bronquios, bronquiolos, alveolos, tejido conectivo peribronquial, peribronquiolar e interlobulillar y pleura.

[1] Leica Instruments, Gmbh, Nussloch, Alemania

Las lesiones microscópicas de neumonía broncointersticial compatibles con infección por Mh se clasificaron en función de la hiperplasia del BALT siguiendo los criterios semicuantitativos descritos por Livingston y cols., en 1972, basados en un estudio experimental que se resume en la siguiente tabla:

Tabla 10: Clasificación semicuantitativa de las lesiones histopatológicas compatibles con infección por Mh propuesta por Livingston y cols., (1972). Atendiendo a las lesiones observadas, según el tiempo transcurrido desde de la inoculación de Mh *(dpi, días post-inoculación)* las lesiones se clasifican en –, grado I, II, III y IV.

	Grado	(dpi)	Descripción
	-	0	Ausencia de lesión.
	+ (I)	10	Presencia de infiltrado linfocítico formando uno o más folículos linfoides en submucosa sin afectar a la muscular de la mucosa.
	++ (II)	14	Presencia de uno o más folículos linfoides que invaden la muscular de la mucosa. Escasa presencia de neutrófilos en la luz de bronquios, bronquiolos y alveolos. Leve engrosamiento de paredes alveolares por la presencia de infiltrado inflamatorio.
	+++ (III)	37	Hiperplasia del tejido linfoide perivascular y peribronquial con presencia de numerosas células inflamatorias en paredes alveolares. Severa presencia de neutrófilos y eosinófilos en luz de bronquios, bronquiolos y alveolos.
	++++ (IV)	42	Severa hiperplasia de tejido linfoide perivascular y peribronquial invadiendo extensas áreas del pulmón, comprometiendo la luz de las vías aéreas. Se pueden observar lóbulos completos invadidos por edema y gran cantidad de neutrófilos.

3.2.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

- ✓ ***Estudio 1 y 2.***

Se realizó técnicas IHQ utilizando un panel de Acs para determinar la presencia de **Mh, PRRSv y/o PCV2** en los casos del **estudio 1** donde se identificaron patologías respiratorias, para complementar el diagnóstico morfológico e histopatológico y determinar el diagnóstico etiológico. Y en todos los animales del **estudio 2.**

Las muestras tisulares incluidas en parafina, fueron cortadas a 3 µm y recogidas en portaobjetos tratados con Poly-L-lysina[2], para evitar el desprendimiento del tejido durante la realización de la técnica y se incubaron al menos durante 18 horas en estufa a 37ºC para lograr la mejor adherencia del corte al portaobjeto.

Se incluyeron dos cortes de una muestra de la que se conocía con antelación la presencia del Ag correspondiente (control positivo). Uno de estos cortes siguió el mismo proceso que las muestras problema, mientras que en el segundo corte se sustituyó el Ac primario por suero normal de cabra al 10% en PBS (control negativo). La presencia de inmunorreacción en el primer corte indicaría un correcto desarrollo de la técnica, mientras que el segundo corte nos permitiría detectar posibles reacciones inespecíficas.

Las muestras se desparafinaron y rehidrataron mediante pases sucesivos por xilol y alcoholes de graduación decreciente. Previo al inicio de la técnica, se llevó a cabo la inhibición de la peroxidasa endógena tisular, mediante la inmersión de los cortes en una solución de peróxido de hidrógeno en metanol al 3% durante 30 minutos. En función del Ag a detectar, se siguieron distintos métodos de desenmascaramiento antigénico y se utilizaron Acs primarios monoclonales (PRRSv y PCV2) y policlonal (Mh), y anticuerpos secundarios. La demostración de los Ags se realizó utilizando la técnica del Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)[3], siguiendo los métodos básicos descritos anteriormente por otros autores (Halbur et al. 1994; McNeilly et al., 2001).

A continuación se detallan los pasos seguidos durante el desarrollo de la IHQ, indicando las especificaciones para la detección de cada uno de los agentes etiológicos:

- **Desparafinado** mediante tres pase en xilol de 10, 5 y 5 minutos
- Alcohol al 100% durante 5 minutos.
- **Inhibición de la peroxidasa endógena** en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos en agitación suave.
- **Rehidratación** de la muestra mediante tres pases en alcohol al 100, 90 y 70% de 5 minutos cada uno.
- Dos lavados en agua destilada de 5 minutos cada uno.
- Lavado con PBS pH 7,2 durante 5 minutos en agitación.
- **Desenmascaramiento antigénico** (específico para cada técnica):
    - ✓ **Mh:** Reacción enzimática con Proteasa al 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
    - ✓ **PRRSv:** Reacción enzimática con Proteasa al 0,1% durante 8 minutos a 37ºC.
    - ✓ **PCV2:** Sin desenmascaramiento antigénico.

[2] Sigma Chemical Company, St. Louis MO, USA
[3] Vectastain® *Elite* ABC Kit, Vector Laboratories, Inc. Burlingame CA, USA

- Lavado con PBS, tres pases de 5 minutos.
- **Incubación con suero normal de cabra** al 10% en PBS, en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- **Incubación con el Ac primario específico** en cámara húmeda durante 18 horas a 4ºC.
    - ✓ **anti-Mh**[4] a una dilución 1:600 en suero normal de cabra al 1% en PBS.
    - ✓ **anti-PRRSv (1AC7 cepa europea)**[5] a una dilución 1:250 en suero normal de cabra al 1% en PBS.
    - ✓ **anti-PCV2 (36A9)**[5] a una dilución 1:200 en suero normal de cabra al 1% en PBS.
- Retirar la cámara húmeda de la nevera 1 hora antes para atemperar las muestras.
- Lavado con PBS, 3 pases de 5 minutos.
- **Incubación con el Ac secundario biotinado**[6] **específico**, a temperatura ambiente en cámara húmeda 30 minutos.
    - ✓ **Mh:** cerdo anti-conejo en una dilución 1:200 en suero normal de cabra al 1% en PBS.
    - ✓ **PRRSv:** conejo anti-ratón en una dilución 1:20 en suero normal de cabra al 1% en PBS.
    - ✓ **PCV2:** conejo anti-ratón en una dilución 1:20 en suero normal de cabra al 1% en PBS.

- Lavado con PBS, 3 pases de 5 minutos.
- **Incubación con el Complejo SBP**[3] a una dilución 1:50 en PBS durante 1 hora, en cámara húmeda en oscuridad.
- Lavado con PBS, 3 pases de 5 minutos.
- **Revelado de la reacción** por inmersión en 3-amino-9-etilcarbazol (AEC)[2], disolviendo 20 mg del revelador en 5 ml de N,N dimethylformamide[2], 70 ml de tampón acetato sódico 0,1 M ph 5,2 y 75 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. Filtración a través de papel de filtro doble e inmersión de los cortes observando el control positivo.
- Lavado en agua corriente 5 minutos.
- **Contratinción** con Hematoxilina de Mayer 5 minutos.
- Lavado en agua corriente 10 minutos.
- Montaje en medio acuoso.

[4] Dr N.C. Feld, Danish Veterinary Diagnostic Laboratory, Copenhagen V, Denmark
[5] Ingeniería y Genética Aplicada, SA, Madrid, España
[6] DAKO, Glostrup, Denmark

Las especificaciones para cada una de las técnicas IHQs realizadas se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 11: Especificaciones del protocolo de IHQ para la detección de Ags de Mh, PRRSv y PCV2. Relación de Acs (primarios y secundarios biotinados), concentración [], tiempo y temperatura de incubación y tiempo de revelado específicos empleados en cada protocolo de IHQ. *[a]Ac Policlonal, [b]Ac Monoclonal, [c]Ac estandarizado (Quesada-Canales, 2015). [1] Dr. Feld, Danish Veterinary Diagnostic Laboratory, Copenhagen V, Denmark [1] Ingeniería y Genética Aplicada, SA, Madrid, España.*

IHQ	ANTÍGENOS		
	Mh	**PRRSv**	**PCV2**
Desenmascaramiento antigénico	Proteasa 0,1% (Tª ambiente)	Proteasa 0,1% (8' - 37ºC)	---
Ac primario []	Dr. Feld[4] [1:600][a]	1AC7 cepa europea[5] [1:250][b]	36A9[5c] [1:200][b]
Ac secundario biotinado []	Cerdo anti-conejo [1:200]	Conejo anti-ratón [1:20]	Conejo anti-ratón [1:20]
Tiempo de Revelado (Observando C+)	4-5'	2-3'	30''-2'

3.2.4 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Se realizó estudio microbiológico del ejemplar N8 perteneciente al **estudio 1**, del cual se remitieron muestras de órganos con lesiones (intestino, hígado, tonsila y LNs mesentérico) conservadas en frascos estériles individuales refrigeradas a 4ºC.

En el Servicio de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria se llevó a cabo un análisis bacteriológico mediante bacterioscopía (tinción de Gram), cultivo y aislamiento (Agar Sangre, Agar Mac Conkey, Agar Sabouraud, Agar Baird-Parker y Agar Hektoen) e identificación de colonias bacterianas con el test API 20E Biomeriex.

La tipificación de la cepa bacteriana se realizó en el Laboratorio Nacional de Referencia - Salmonelosis (Laboratorio Central de Veterinaria, MARM, Algete, Madrid).

3.2.5 ESTUDIO SEROLÓGICO

Para la realización del **estudio 3** fue necesario la obtención de muestras séricas a partir de 1) muestras de sangre extraídas en los ejemplares presentes en las distintas explotaciones y 2) en el momento de la exanguinación de los ejemplares sacrificados en matadero (estudio 2). Además se conservaron muestras de pulmón en congelación para la posterior obtención de extractos pulmonares.

3.2.5.1 EXTRACCIÓN DE SANGRE EN EJEMPLARES VIVOS

Los lugares de punción elegidos para realizar la extracción de sangre en este estudio fueron: la vena cava craneal o la vena yugular (Ilustración 10), siendo el método de sujeción y estabilización de los animales diferentes en función del tamaño (lechones, animales de cebo y reproductores).

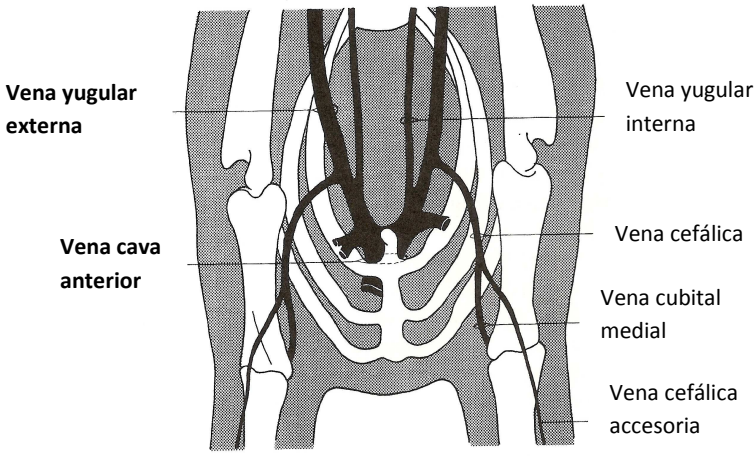


Ilustración 10. Lugares de punción empleados para la extracción de sangre en porcino. Traducido de Straw y cols., (1999).

Para la extracción de sangre a los **lechones** se inmovilizó a los animales en decúbito supino, con el cuello estirado, el cuerpo recto y sujetando las extremidades delanteras hacia caudal (Ilustración 11). Tomando como referencia el mango o manubrio del esternón y borde craneal de la primera costilla, para localizar la vena cava craneal (Ilustración 10). La aguja (20 G., 38 mm) se introdujo en el lugar de punción en dirección ventro-medio-caudal.

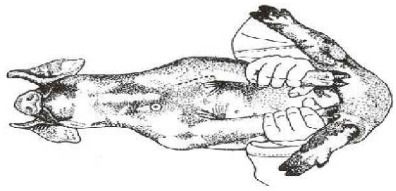


Ilustración 11. Inmovilización y puntos de referencia para la extracción de sangre en lechones. Punción de la vena cava craneal (Straw y cols., 1999).

Para la extracción de sangre a los **animales de cebo** y los **reproductores**, se inmovilizó a los animales con un lazo a nivel maxilar. La punción de la vena yugular externa o la vena cava craneal (Ilustración 10) se realizó tomando como puntos de referencia el manubrio del esternón, articulación del codo y el borde medial del músculo braquiocefálico (Ilustración 12). La aguja (18 G., 65 mm o 16G., 90mm) se introdujo en el lugar de punción en sentido dorso-medio-caudal.

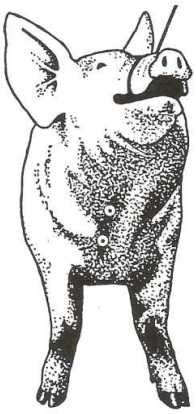


Ilustración 12. Inmovilización y puntos de referencia en animales de transición y cebo. Punción en vena yugular externa (círculo superior) **y vena cava craneal** (círculo inferior). (Straw y cols., 1999).

En cualquier caso, la extracción de sangre siempre se intentó realizar en el lado derecho del animal, ya que el nervio vago derecho presenta una menor inervación hacia el corazón y diafragma que el izquierdo (VanAlstine, 2012).

3.2.5.2 OBTENCIÓN DE SANGRE EN ANIMALES SACRIFICADOS EN MATADERO

La obtención de sangre en los animales sacrificados en matadero se realizó en el momento de la exanguinación. Se evitó coger la sangre del tercio inicial del desangrado, para evitar así la posible contaminación con restos presentes en la piel de los animales o en el cuchillo del técnico. La muestra se obtuvo colocando el tubo vacutainer abierto en la línea del flujo de sangre.

3.2.5.3 OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DEL SUERO SANGUÍNEO

Las muestras de sangre de los animales vivos presentes en las explotaciones y sacrificados en matadero se recogieron en tubos vacutainers de 5 ml sin anticoagulante y se mantuvieron refrigeradas a 4-8ºC hasta su llegada al laboratorio, donde se procedió donde se procedió a la centrifugación de las muestras a 5000rpm durante 3 minutos. Posteriormente, se extravasó el sobrenadante **(suero sanguíneo)** a tubos eppendorf de 1,5 ml y se conservó en congelación a -80ºC hasta la realización de las diferentes técnicas serológicas.

3.2.5.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PULMONARES

Para la realización de las técnicas de ELISA con extractos pulmonares fue necesaria la obtención del mismo a partir del tejido pulmonar recogido en matadero (durante el desarrollo del estudio 2).

Los extractos pulmonares se obtuvieron siguiendo la técnica desarrollada por Ferroglio y cols., (2000). El protocolo seguido se describe a continuación (Ilustración 13):

- Pesar 2,5 gr de tejido pulmonar fraccionándolo en varias piezas.
- Dejar a temperatura ambiente 20 minutos en un vacutainer con 2 ml de PBS pH 7,2.
- Dejar el tubo en agitación suave (100rpm) durante 4 minutos.
- Centrifugar a 3000rpm durante 10 minutos.
- Retirar las piezas de tejido del tubo y extraer el sobrenadante.
- Almacenar el extracto pulmonar a -20ºC durante 24 horas.
- Retirar de congelación y dejar atemperar.
- Calentar el extracto durante 30 minutos a 56ºC en baño maría.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos y retirar el sobrenadante que se usará durante la técnica de ELISA.

Ilustración 13: Protocolo seguido para la obtención de extracto de tejido pulmonar.

3.2.5.5 TÉCNICAS DE ELISA

En el **estudio 3** se realizaron técnicas de ELISA empleando kits comerciales específicos para la detección de Acs frente a Mh, PRRSv, y PCV2. En el caso de PCV2, el kit comercial elegido permitió la detección de IgG e IgM pudiendo determinar así el momento de la infección.

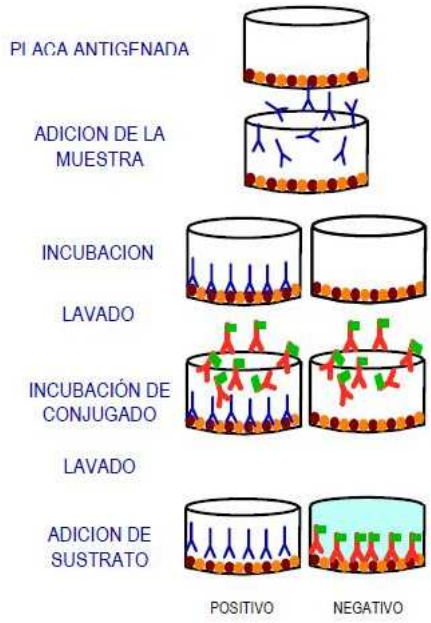
Para el **estudio de seroprevalencia**, las muestras de suero sanguíneo obtenidas de animales vivos fueron procesadas por duplicado, considerando la media aritmética de los valores de densidad óptica (DO) obtenidos. Igualmente, se realizó la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para control positivo (C+) y los dos pocillos para el control negativo (C-). Para **estudiar la viabilidad del uso de extractos pulmonares en técnicas de ELISA** también se procesaron por duplicado las muestras de suero sanguíneo de animales sacrificados en matadero y sus correspondientes extractos pulmonares, considerando igualmente la media aritmética de los valores de densidad óptica (DO) obtenidos en cada caso.

La lectura se realizó con un lector de ELISA (Anthos 2020 version 1.8 up) utilizando filtro de 450 nm. Los lavados de las placas se realizaron empleando un lavador automático (Anthos fluido).

- ✓ ***Mycoplasma hyopneumoniae (Mh)***

Para la detección de Acs frente a Mh se utilizó el kit comercial de ELISA de bloqueo (INGEZIM M.HYO COMPAC Prod. Ref: 11.MHY.K3.).

Se aplicó el protocolo siguiendo las recomendaciones del laboratorio que, de forma resumida, se expone a continuación:



Sobre una placa de poliestireno, se fija los Ags de Mh. Al añadir las muestras de suero, en el caso de contener Acs específicos, estos se unirán al Ag. Tras eliminar el material no unido mediante lavados, se añade un conjugado específico marcado con peroxidasa (Ac monoclonal específico para Mh). En el caso de que las muestras presentaran Ac frente al Ag, estos no permitirían la unión del conjugado, mientras que si las muestras no contienen Ac, el conjugado se unirá libremente al Ag de la placa. Esta unión se detecta tras la adición de un sustrato adecuado que desarrolla color en presencia de peroxidasa. Así, la presencia de color indicará ausencia de Ac frente a Mh en la muestra, mientras que la ausencia de color revelará la presencia de Ac frente a Mh.

- Validación de resultados:
  - DO C+ / DO C- < 0,25.
  - DO C- > 0,75.
- Cálculo de punto de corte (PC):
  - PC (-) = 0,45 x C-.
  - PC (+) = 0,40 x C-.

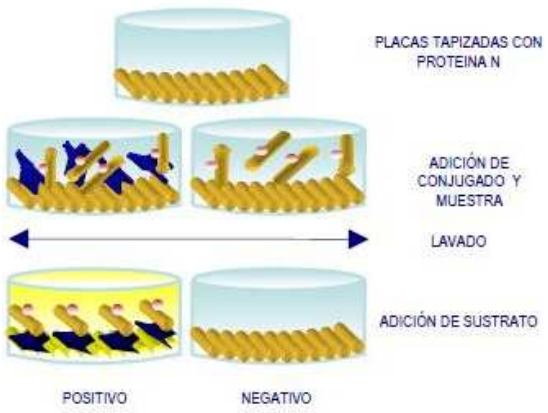
- Interpretación:

Las muestras se consideraron POSITIVAS (presencia de anticuerpos frente a Mh), cuando su DO a 450 nm fue igual o inferior al PC positivo (40% del C-). Las muestras se consideraron NEGATIVAS (ausencia de anticuerpos frente a Mh), cuando su DO a 450 nm fue igual o superior al PC negativo (45% del C-). Las muestras que presentaron porcentajes de unión entre ambos valores se consideraron DUDOSAS y en estos casos la recomendación del laboratorio es testar de nuevo al animal transcurridas 2 semanas.

✓ ***Virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSv)***

Para la detección de anticuerpos frente al PRRSv se utilizó el kit comercial de ELISA de doble reconocimiento para la detección temprana de anticuerpos (INGEZIM PRRS DR Prod. Ref: 11.PRS.K0.), kit diseñado para detectar niveles muy bajos de anticuerpos en suero o plasma de animales infectados y vacunados.

Se aplicó el protocolo siguiendo las recomendaciones del laboratorio que, de forma resumida, se expone a continuación:



En placas de poliestireno fijadas con el antígeno (Ag) de PRRS (proteína recombinante N) se dispensa el suero problema, en el caso de que existan anticuerpos (Ac) específicos frente a este antígeno, éstos quedarán fijados a la misma. Al añadir proteína N conjugada con peroxidasa, ésta quedará unida a los Ac fijados previamente. Esta unión se detecta tras la adición de un sustrato adecuado para desarrollar color en presencia de peroxidasa.

- Validación del test:
  - DO a 450 nm del C+ superior a 1,4
  - DO a 450 nm del C- menor de 0,25.

- Cálculo PC:

El PC se obtuvo al multiplicar la DO del C+ por 0,175.

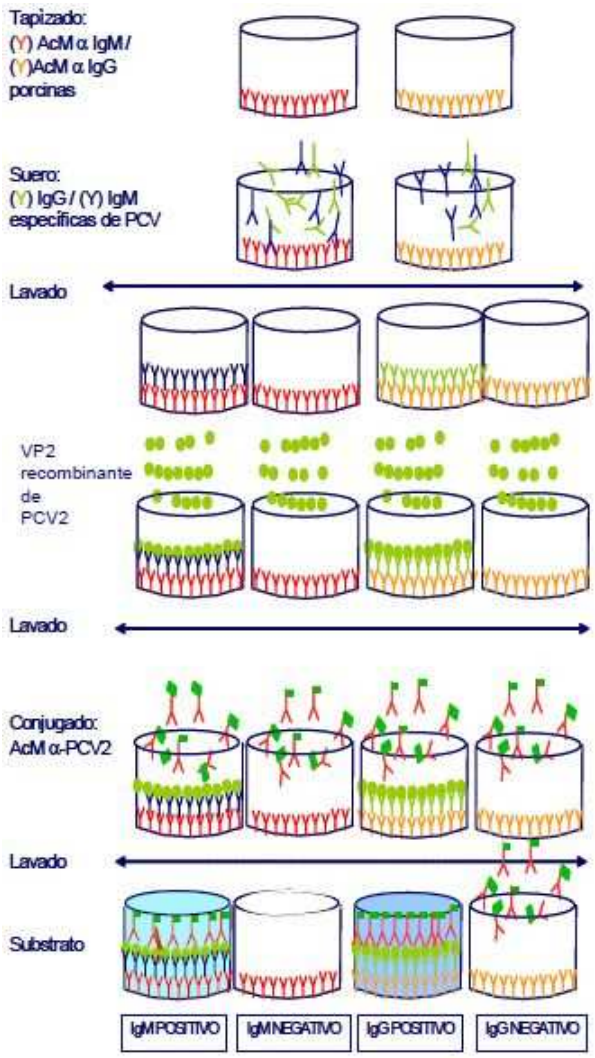
- Interpretación de los resultados:

Las muestras con DO mayor al PC se consideraron positivas a Ac para PRRSv. Las muestras con DO menores de éste valor fueron consideradas negativas para PRRSv.

✓ ***Circovirus porcino tipo 2 (PCV2)***

En la detección de anticuerpos frente a PCV2 se utilizó el kit comercial de ELISA de captura que nos permitió la identificación y cuantificación de anticuerpos tipo IgM e IgG específicos (INGEZIM CIRCOVIRUS IgG/IgM Prod Ref: 11.PCV.K2.).

Se aplicó el protocolo siguiendo las recomendaciones del laboratorio que, de forma resumida, se expone a continuación:



Dos anticuerpos monoclonales (AcMs), uno específico de IgG de cerdo y otro específico de IgM son fijados a placas diferentes. Cuando las muestras se añaden a las placas los anticuerpos (Ac) IgM e IgG presentes en el suero problema serán capturados por el AcM de cada placa. Tras lavar para eliminar el material no unido, se añade el antígeno (Ag) (cápsidas vacías recombinantes de PCV) que quedará unido al pocillo solo si el suero problema contiene IgM y/o IgG específicas del PCV2. Tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, se demuestra la presencia de éste Ag mediante la adición de un AcM específico del PCV conjugado con peroxidasa. Tras la adición del sustrato adecuado, los pocillos con el suero problema con Ac IgM y/o IgG específicos presentan una reacción coloreada, mientras que en los pocillos con sueros problemas negativos, no aparece reacción coloreada.

- Validación del test:
  - DO del C+ en los pocillos de la IgG y la IgM es mayor que 0,7.
  - DO del C- en los pocillos de la IgG y la IgM es menor que 0,3.

- Cálculo de PC:

Utilizando el correspondiente valor del C+ para la IgG e IgM se calculó la línea de corte de la siguiente manera:

- PC para IgM:
  DO (450 nm) IgM C+ x 0,4.
- PC para IgG:
  DO (450 nm) IgG C+ x 0,3.

- Interpretación:

- Muestras con valores de DO menores al punto de corte:

Se consideran como muestras con títulos para circovirus menores o igual a 1/100 para IgG y/o IgM. Esto se corresponden con animales negativos o que han tenido contacto muy antiguo con el virus.

- Muestras con valores de DO mayores al punto de corte:

Se podría haber distinguido tres situaciones:

1. DO de IgM > IgG: INFECCIÓN ACTIVA.
2. DO de IgG > IgM y el título de la IgM > 1/100: INFECCIÓN RECIENTE (entre uno y dos meses)
3. DO IgG > IgM OD y el título de la IgM < 1/100: INFECCIÓN ANTIGUA.

3.2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO (EXTRACTOS PULMONARES EMPLEADOS EN TÉCNICAS DE ELISA)

En el **estudio 3**, se llevó a cabo un análisis estadístico, para la **evaluar el uso de extractos pulmonares en técnicas de ELISA como muestra alternativa al suero sanguíneo.**

Se determinó la concordancia entre el número de animales positivos y negativos, obtenidos mediante el test de ELISA, para ambos tipos de muestras analizados (suero sanguíneo y extracto de tejido pulmonar). Se estimó el estadístico Kappa para cada test de ELISA (Mh, PRRSv y PCV2), considerando una concordancia moderada cuando el estadístico Kappa se encontraba comprendido dentro del intervalo 0,41-0,60; bueno si estaba dentro del intervalo 0,61-0,80 y finalmente muy bueno si kappa era mayor que 0,8.

Además se calculó el coeficiente de correlación de Pearson, para cada test de ELISA (Mh, PRRSv y PCV2) a partir de los valores de DO obtenidos para cada variable (suero sanguíneo y extracto de tejido pulmonar.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el programa R, versión 3.0.1.

RESULTADOS

4.

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDIO 1: ESTUDIO DE CAUSAS DE MUERTE (2007-2012)

4.1.1 ANIMALES OBJETO DE ESTUDIO

Durante el periodo comprendido entre el año 2007 y 2012, se remitieron al Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico un total de 25 ejemplares de la raza porcina Negro Canario.

De los animales estudiados, según el rango de edad, el 64% (16) eran lechones con edades comprendidas entre 1 mes y 3,5 meses, el 8% (2) animales de cebo y el 28% (7) restantes, reproductores. Del total de los animales, un 40% (10) eran lechones hembras y un 24% (6) lechones machos, seguido de un 8% (2) de animales de cebo machos y un 16% (4) y 12% (3) de reproductores hembras y machos (Gráfico 1).

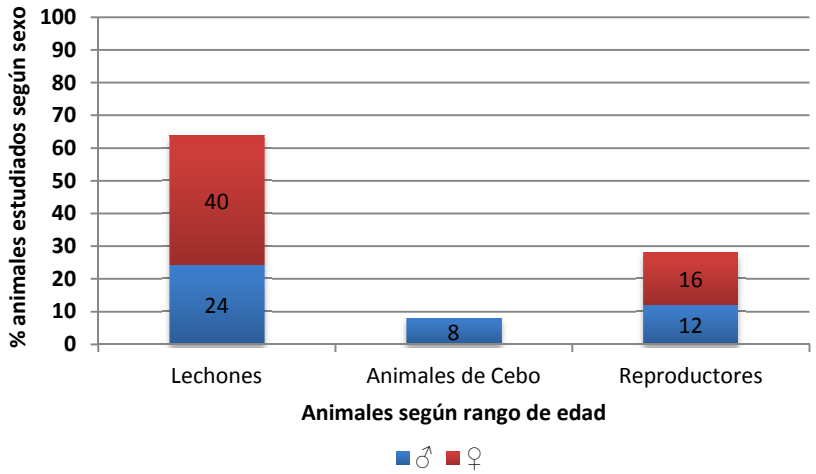


Gráfico 1: **Clasificación de los animales por sexo, según el rango de edad.** Porcentaje de animales machos (♂) y hembras (♀) observados según su rango de edad (lechones menores de 3,5 meses; animales de cebo mayores de 3,5 meses y reproductores mayores de 1 año)

4.1.2 DESCRIPCIÓN DE LESIONES MACROSCÓPICAS Y DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO

Siguiendo el protocolo de necropsias, se realizó exploración externa de los animales y se inspeccionó el tegumento (piel, mucosa y tejido subcutáneo), cavidades (pelviana, abdominal y torácica), saco pericárdico y los distintos órganos y sistemas: digestivo (esófago, estómago, intestino delgado y grueso), glándulas anexas (páncreas e hígado), urinario (riñón y vejiga), sistema cardiovascular (corazón y grandes vasos), respiratorio (tráquea, bronquios principales y pulmones), órganos y tejidos linfoides (timo, bazo, linfonodos, tonsila y placas de Peyer), musculoesquelético (músculos, huesos y articulaciones) y SNC y meninges. Se describieron las principales lesiones macroscópicas observadas en los distintos órganos, estableciendo un diagnóstico morfológico.

El **tegumento**, presentó lesiones en un 32% (8) de los animales estudiados; siendo un 12% (3) lechones, un 4% (1) animales de cebo y un 16% (4) reproductores.

En las **cavidades** se observó algún tipo de trasudado en el 40% (10) de los animales, siendo un 24% (6) lechones, un 4% (1) animales de cebo y un 12% (3) reproductores.

Las **serosas** de los distintos órganos se vieron afectadas en el 60% (16) de los animales, siendo un 40% (10) lechones, 8% (3) animales de cebo y 12% (3) reproductores.

Por su parte, el **hígado** presentó algún tipo de lesión en el 40% (10) de los animales, afectando principalmente a los lechones (32%, 8) y a los reproductores (8%, 2).

Además, se observaron lesiones en el **sistema digestivo** en un 64% (16) de los casos, siendo un 32% (8) lechones, un 8% (2) animales de cebo y un 24% (6) reproductores.

En el **sistema urinario**, concretamente en riñones, un 16% (4) de los animales presentaron lesiones macroscópicas, siendo lechones un 4%(1); animales de cebo, otro 4% (1) y reproductores un 8% (2).

El **sistema cardiovascular**, fundamentalmente el corazón, presentó lesiones en el 36% (9) de los casos, siendo un 16% (4) lechones y el 20% (5) restante, los reproductores.

De todos los sistemas inspeccionados, se observó que el **sistema respiratorio** fue el más afectado, observándose algún tipo de lesión en el **68% (17) de los animales**, siendo un 44% (11) lechones, un 4% (1) animales de cebo y un 20% (5) reproductores.

Los **órganos linfoides** estaban afectados en el 48% (12) de los animales, siendo el 32% (8) lechones, un 8% (2) animales de cebo y otro 8% (2) reproductores.

El **sistema musculo-esquelético** también se vio afectado, observándose lesiones macroscópicas en el 28% (7) de los animales afectados, afectando en un 12% (3) a lechones y el 16% (4) restante a reproductores.

Finalmente, fue posible detectar lesiones macroscópicas en **SNC** (encéfalo y meninges), afectando también a meninges en un 36% (9) de los casos; siendo 24% (6) lechones y 12% (3) reproductores.

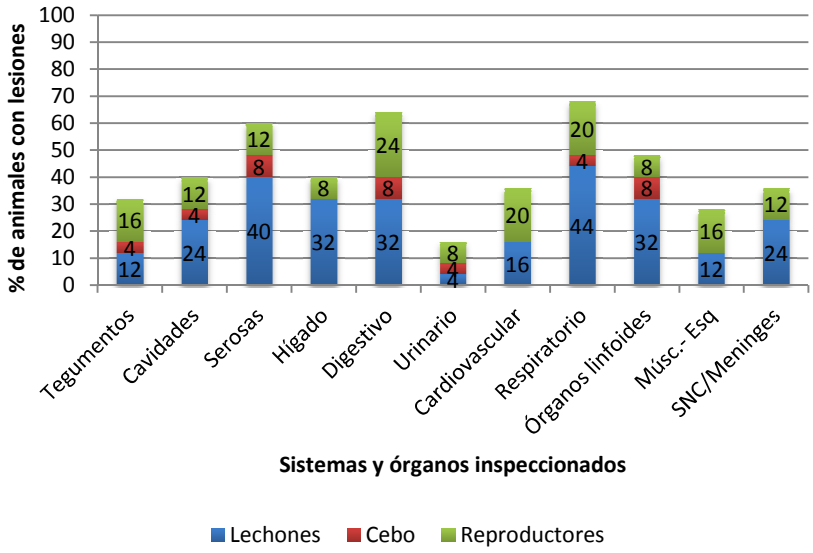


Gráfico 2: Sistemas y órganos con lesiones macroscópicas. Porcentaje de animales, clasificados según su rango de edad, que presentaron algún tipo de lesión macroscópica en los distintos sistemas inspeccionados.

Las principales lesiones observadas en el **sistema respiratorio** y concretamente en los pulmones, fueron debidas principalmente a procesos inflamatorios en el 56% (14) de los animales, alteraciones en el inflado en el 12% (3) y trastornos circulatorios en un 36% (9).

Las lesiones asociadas a **procesos inflamatorios a nivel pulmonar** se correspondieron con áreas de consolidación craneoventral del parénquima pulmonar, afectando a lóbulos craneales y medio, pudiendo afectar también al accesorio y caudales, deprimidas o levemente sobreelevadas, delimitada a los lobulillos, de coloración que iba del rojo oscuro (Fig. 7B, N22) al gris (Fig. 5. C, N10) y de extensión variable, que al corte rezumaban exudado rojizo-grisáceo a través de las vías aéreas, correspondiéndose con *bronconeumonía supurativa*. Además, se observó consolidación difusa del parénquima pulmonar, de superficie brillante, coloración pálida, consistencia elástica, con ausencia de colapso pulmonar, y en ocasiones, con impresiones costales sobre el parénquima pulmonar, correspondiéndose con procesos de *neumonía intersticial* (Fig. 10B, N14), acompañado ocasionalmente por lesiones multifocales con demarcación del patrón lobular, de coloración roja oscura (Fig. 7A, N22). En algunos casos pudieron verse, de forma combinada, estas lesiones de bronconeumonía supurativa y neumonía intersticial (Fig. 1B, N16). Otro hallazgo que se observó, asociada a procesos de bronconeumonía supurativa, fue la presencia de una lesión focal en lóbulo caudal izquierdo, sobreelevada, mal delimitada, circular, de 5cm de diámetro, aproximadamente; color rojo intenso, con región central rojo oscura y bordes blanquecinos, correspondiéndose con un proceso de *bronconeumonía fibrinonecrótica* (Fig. 4B, N9).

Asociado a **trastornos circulatorios** se observó un marcado patrón lobulillar por el engrosamiento de los septos interlobulillares debida a la presencia de trasudado transparente de aspecto gelatinoso en su interior *(edema intersticial)* (Fig. 1B, N16) y una lesión focal en pleura con pérdida de continuidad y salida de sangre a la cavidad torácica *(hemorragia)*. Asociados a **alteraciones en el inflado**, fue posible apreciar en el parénquima pulmonar áreas deprimidas, de distribución aleatoria, coloración rosada violácea más oscura, de consistencia elástica o firme y extensión variable *(atelectasia)* (Fig. 2A, pulmón izquierdo, N7), así como la dilatación de septos interlobulillares por la presencia de gas *(enfisema intersticial)*.

Del total de animales analizados inicialmente (25) fue posible observar bronconeumonía supurativa en un 24% (6) de los animales, neumonía intersticial en un 12% (3), lesiones combinadas de bronconeumonía supurativa y neumonía intersticial en un 16% (4) de los animales y de bronconeumonía supurativa y bronconeumonía fibrinonecrótica en un 6% (1), edema intersticial en un 32% (8), hemorragia pleural en un 6% (1), atelectasia en un 12% (3) y enfisema intersticial en un 6% (1) de los animales.

---

*En el desarrollo de esta sección se analizará **únicamente** aquellos **casos** en los que se observaron **lesiones macroscópicas en el sistema respiratorio asociadas a procesos inflamatorios**. Teniendo en cuenta 2 aspectos: 1) se corresponde con la línea de investigación seguida en esta tesis y 2) el objetivo genérico de esta sección es: estudiar la/s causa/s de muerte en esta raza, para identificar aquellos casos en los que se viera comprometido el sistema respiratorio e intentar determinar la participación de Mh, PRRSv o PCV2 en el desarrollo de dichas lesiones, estableciendo un diagnóstico etiológico en los casos donde fuera posible.*

En los 14 animales que presentaron lesiones en el sistema respiratorio asociadas a procesos inflamatorios y que fueron objeto de estudio en esta sección, se observó que un 43% (6) presentaba bronconeumonía supurativa, un 21% (3) neumonía intersticial, la combinación de ambas en un 29% (4) y la combinación de bronconeumonía supurativa y bronconeumonía fibrinonecrótica en un 7% (1).

Estos animales presentaron, además, lesiones en otros sistemas u órganos (Tabla 12 y 13), que serán descritas a continuación:

Así, se observaron lesiones en **tegumento** en el 43% (6) de los animales. Se observaron lesiones multifocales en flancos y región del cuello de un animal, caracterizadas por alopecia, marcada hiperqueratosis y presencia de gruesas costras de color gris, de extensión variable, desde unos pocos centímetros hasta lesiones más extensas *(dermatitis hiperplásica con hiperqueratosis)* (Fig. 9A, N13). Otros hallazgos fueron áreas multifocales, localizadas en región inguinal, abdomen y tórax, algunas planas y otras levemente sobreelevadas, bien delimitadas de coloración rojiza *(máculas y pápulas)* (Fig. 8A, N5). En región abdominal de un animal se observó la presencia de lesiones multifocales, bien delimitadas, circulares, de 1cm de diámetro aproximadamente, sobreelevadas, de coloración rojiza y con presencia de exudado purulento *(dermatitis pustular)* (Fig. 10A, N14). En otro fue posible observar una intensa coloración amarillenta, tanto en región abdominal e inguinal como en mucosa oral y conjuntiva *(ictericia).* El tejido subcutáneo mostró, en ocasiones un aspecto gelatinoso traslúcido *(edema subcutáneo)*. *Así, se describió edema subcutáneo en un 14% (2), dermatitis hiperplásica con hiperqueratosis, máculas y pápulas, dermatitis pustular o ictericia, cada una en un 7% (1) de los animales (Tabla 12 y 13).*

En las **cavidades corporales** del 43% (6) de los animales, se observó presencia de trasudado seroso, traslúcido, amarillento en cavidad torácica *(hidrotórax)* (Fig. 6A, N17), *saco pericárdico (hidropericardio)* (Fig. 9B, N13) *y cavidad abdominal (ascitis)* (Fig. 6B, N17). *Un 29% (4) de los animales presentó hidrotórax, un 43% (6) hidropericardio y finalmente, en un 29% (4) se observó ascitis (Tabla 12 y 13).*

Las **serosas** de los órganos alojados en las distintas cavidades presentaron lesiones macroscópicas en un 79% (11) de los animales. Se pudo observar, adherida a la serosa de los distintos órganos (asas intestinales, corazón, pulmón), la presencia de exudado blanquecino amarillento, variando su consistencia de lábil a filamentosa, formando en ocasiones flóculos dentro de las respectivas cavidades *(exudado fibrinoso)* acompañado por trasudado amarillento traslúcido, hasta organizarse formado tejido fibroso en los procesos más crónicos. De esta forma, se observó exudado fibrinoso en la serosa de asas intestinales, hígado, bazo, etc. alojados en cavidad abdominal *(peritonitis fibrinosa)* (Fig. 5E, N11), en saco pericárdico *(pericarditis fibrinosa)* (Fig. 5. A, N12), así como en pleura *(pleuritis fibrinosa)* (Fig. 1A, N4). En los casos más crónicos, se observó proliferación de tejido fibroso dando lugar a adherencias entre pericardio visceral y saco pericárdico *(pericarditis fibrosa)* (Fig. 2. B, N7); y en pulmones, en pleura visceral formando adherencias entre los distintos lóbulos o entre la pleura y la pared costal *(pleuritis fibrosa)* (Fig. 4A, N9). *Así, del total de los animales se observó peritonitis fibrinosa leve a moderada en el 79% (11), pericarditis fibrinosa en un 14% (2) y evolucionando a pericarditis fibrosa en otro 14% (2); así como, pleuritis fibrinosa en un 29% (4) evolucionando a pleuritis fibrosa en otro 7% (1) de los casos (Tabla 12 y 13).*

El 43% (6) de los animales presentaba lesiones en **hígado.** Los principales hallazgos macroscópicos se correspondieron con lesiones multifocales, mal delimitadas, planas en superficie, de morfología irregular y tamaño variable, blanquecinas, identificadas como “manchas de leche” que al corte, se extendieron en profundidad, compatibles con migraciones parasitarias *(Ascaris suum)* de formas larvarias *(hepatitis fibrosa parasitaria)* (Fig. 1B, N16). En algunos casos, estas lesiones estuvieron acompañadas por áreas circulares, bien delimitadas, sobreelevadas, de pequeño tamaño (1-2mm aprox.), blanquecinas y de consistencia firme. También se pudo observar, en la cara visceral del lóbulo hepático lateral derecho, una lesión multifocal, coalescente, localmente extensa, pobremente

delimitada, plana, circular, de unos 5cm de diámetro aproximadamente, blanquecina, de consistencia blanda que al corte se extendía en profundidad *(necrosis hepática)* (Fig. 3D, N8). En este animal se observó, en vesícula biliar, distensión, leve engrosamiento de la pared por la presencia de edema y bilis de aspecto arenoso (Fig. 3D *Inset*, N8). En ocasiones, el hígado presentó severa congestión con marcado patrón lobulillar (Fig. 6A, N17). *Se observó, por tanto, hepatitis fibrosa parasitaria en un 21% (3) de los animales, necrosis hepática en un 7% (1) y congestión en un 21% (3) (Tabla 12 y 13).*

En el **sistema digestivo** se observaron lesiones macroscópicas en el 43% (6) de los animales. **A nivel gástrico**, se pudo observar, en mucosa de la región fúndica glandular una lesión focal, bien delimitada, deprimida, lineal, de color rojo oscuro casi negro *(úlcera gástrica)* (Fig. 8D, N5) y congestión severa de mucosa y presencia de exudado catarral *(gastritis catarral)* (Fig. 9D, N13). Los principales hallazgos macroscópicos se encontraron **a nivel intestinal** en un 29% (4) de los animales afectando a los distintos tramos. En intestino fue posible observar la presencia de contenido seroso amarillento y congestión de la mucosa *(enteritis catarral)* (Fig. 2D, N7) o exudado blanquecino amarillento friable adherido a la mucosa *(enteritis fibrinosa)*, con leve a moderada congestión de la mucosa. Se encontraron adultos de nematodos *(Ascaris suum)* en un reproductor. En un lechón se observó, en serosa de ciego y colon, la presencia de lesiones multifocales, sobreelevada, circulares principalmente, de 0,5-2cm de diámetro aproximadamente, de consistencia blanda-firme y blanquecinas, (Fig. 3B, N8) que, al corte e inspección de la luz intestinal, se extendían en todo el espesor de la pared (transmural) comprometiendo también la mucosa, observándose lesiones multifocales, bien delimitadas, con bordes sobreelevados, de morfología irregular, variando de 2mm a 2cm, con exudado de color blanquecino amarillento adherido en la región central de las lesiones *(tiflitis y colitis fibrinonecrótica)* (Fig. 3C, N8). *Así, se observó la presencia de úlceras gástricas, gastritis catarral, enteritis catarral y enteritis fibrinonecrótica en un 7% (1) de los animales, cada una de ellas. En un 21% (3) de los casos fue posible observar enteritis fibrinosa (Tabla 12 y 13).*

En **sistema urinario**, se observaron lesiones en el 21% (3) de los animales. Los principales hallazgos macroscópicos se localizaban en corteza renal, observándose lesiones multifocales diseminadas, o localmente extensiva en los casos más crónicos (Fig. 10D, N14), levemente deprimidas, puntiforme en algunos casos (Fig. 8C, N5), de coloración blanquecinas, que al corte, se extendían en profundidad *(nefritis intersticial) (Tabla 12 y 13).*

A nivel **cardiovascular** se observaron lesiones en un 29% (4) de los animales. Los hallazgos más relevantes fueron: en epicardio de orejuela de aurícula o surco interventricular, la presencia de hemorragias multifocales petequiales o equimosis. También se pudo observar la válvula mitral acortada y engrosada, con lesiones multifocales, nodulares, de tamaño variable, coloración blanquecina y consistencia firme *(endocardiosis),* acompañada por otras lesiones multifocales, nodulares, de 2-5mm de diámetro, de color rojo y de consistencia blanda fluctuante, que al corte rezumaban sangre *(quistes hemáticos)* (Fig. 9C, N13). Además, se observaron lesiones multifocales en epicardio de ventrículos, blanquecina a grisáceas, planas, moderadamente delimitadas, con bordes irregulares y consistencia blanda, que al corte se extendía a miocardio *(necrosis de miocardio)* (Fig. 6D *Inset*, N17) y un moderado aumento de tamaño del corazón de aspecto globoso, con moderada a severa dilatación de ambos ventrículos, severa disminución del grosor de la pared del ventrículo izquierdo y coloración blanquecina del endocardio *(cardiomiopatía dilatada)*. *Por tanto, un 14% (2) de los animales presentó hemorragias, un 7% (1) mostró endocardiosis y presencia de quistes hemáticos y otro 7% (1) cardiomiopatía dilatada y necrosis de miocardio (Tabla 12 y 13).*

Los principales hallazgos observados en los **órganos linfoides** del 63% (9) de los animales fueron: el aumento de tamaño de los ***linfonodos*** *(linfoadenomegalia)* (Fig. 1C y D, N4 y N16), de forma generalizada o en alguno de los linfonodos inspeccionados (LN MS, IS, MD, PE y/o PF). Por otra parte, se detectaron lesiones en ***tonsila*** en un 14% (2) de los animales, observándose en criptas tonsilares, exudado blanquecino amarillento *(tonsilitis supurativa)* y ocasionalmente, la presencia de una lesión focal bilateral, bien delimitada, levemente sobreelevada, circular, de 5mm de diámetro aproximadamente, con halo negruzco y centro amarillento *(tonsilitis fibrinonecrótica)* (Fig. 3F, N8). *Así, se observó linfoadenomegalia en el 63% (9) de los animales y tonsilitis supurativa o fibrinonecrótica en un 7% (1) de los casos, cada una (Tabla 12 y 13).*

El **sistema músculo-esquelético** se vio afectado en el 7% (1) de los animales, observándose a nivel articular en codo, rodilla y región tarsiana, tumefacción periarticular, firme a la palpación. Al corte se observó, en capsula articular, proliferación de tejido fibroso de moderada a severa *(artritis fibrosa)* (Fig. 2C, N7) *(Tabla 12 y 13).*

Finalmente, el 43% (6) de los animales analizados presentaron lesiones macroscópicas en **SNC.** Se observó, en ***meninges***, congestión de moderada a severa, acompañada ocasionalmente por hemorragia (Fig. 1E, N4). En ***cerebro***, también se observaron hemorragias petequiales multifocales leves en sustancia blanca (Fig. 1F *Inset*, N16). En ***cerebelo***, fue posible apreciar severas hemorragias petequiales y equimosis multifocal a difusa, a nivel cortical principalmente (Fig. 1F, N16). *Así, se observó congestión en meninges en un 43% (6) de los animales, con hemorragia leve a moderada en un 7% (1). En cerebro y cerebelo, también presentó severas hemorragias petequiales y equimosis un 7% (1) de los animales (Tabla 12 y 13).*

De los 14 animales con procesos inflamatorios a nivel del sistema respiratorio, un 79% (11) eran lechones (69% de los **lechones** totales), un 7% (1) eran **animales de cebo** (50% de los totales) y el 14% restante eran reproductores (29% de los totales) *(Tabla 13).*

Tabla 12: Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes, observadas en los distintos sistemas u órganos inspeccionados. Porcentaje de animales afectados sobre el total de 14 animales que presentaban lesiones de tipo inflamatorio a nivel pulmonar.

SISTEMAS U ÓRGANOS AFECT.	% (N)	DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO	% (N)
Tegumentos	43% (6)	Dermatitis con hiperqueratosis	*7% (1)*
		Máculas y pápulas	*7% (1)*
		Dermatitis pustular	*7% (1)*
		Ictericia	*7% (1)*
		Edema subcutáneo	*14% (2)*
Cavidades	43% (6)	Ascitis	*29% (4)*
		Hidrotórax	*29% (4)*
		Hidropericardio	*43% (6)*
Serosas	79% (11)	Peritonitis fibrinosa	*79% (11)*
		Pleuritis fibrinosa	*29% (4)*
		Pleuritis fibrosa	*7% (1)*
		Pericarditis fibrinosa	*14% (2)*
		Pericarditis fibrosa	*14% (2)*
Hígado	43% (6)	Hepatitis fibrosa (*manchas de leche*)	*21% (3)*
		Necrosis hepática	*7% (1)*
Sist. digestivo	43% (6)	Úlceras gástricas	*7% (1)*
		Gastritis catarral	*7% (1)*
		Enteritis catarral	*7% (1)*
		Enteritis fibrinosa	*21% (3)*
		Enteritis fibrinonecrótica	*7% (1)*
Sist. urinario	21% (3)	Nefritis intersticial	*21% (3)*
Sist. cardiovascular	29% (4)	Hemorragias	*14% (2)*
		Endocardiosis/Quistes hemáticos	*7% (1)*
		Cardiomiopatía dilatada/ Necrosis de miocardio	*7% (1)*
Sist. respiratorio	***100% (14)***	***Bronconeumonía supurativa (BNsup)***	***43% (6)***
		Neumonía intersticial (NI)	***21% (3)***
		BNsup/NI	***29% (4)***
		BNsup/BN fibrinonecrótica	***7% (1)***
Órganos linfoides	63% (9)	Linfoadenomegalia	*63% (9)*
		Tonsilitis supurativa	*7% (1)*
		Tonsilitis fibrinonecrótica	*7% (1)*
Sist. músculoesquelético	7% (1)	Artritis fibrosa	*7% (1)*
SNC	43% (6)	Congestión en meninges	*43% (6)*
		Hemorragia en meninges	*7% (1)*
		Hemorragias petequiales/equimosis en cerebro y cerebelo	*7% (1)*

Tabla 13: Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes, observadas en cada uno de los animales del estudio. Lesiones observadas en los distintos sistemas y órganos de los lechones, animales de cebo (Ceb.) y reproductores (Reprod.) que presentaban lesiones en el sistema respiratorio asociadas a procesos respiratorios (n=14). *BNsup, bronconeumonía supurativa; BNfn, bronconeumonía fibrinonecrótica; NI, neumonía intesrticial.*

Diagnóstico morfológico		Lechones											Ceb	Reprod	
		N4	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N16	N17	N22	N23	N5	N13	N14
Tegumentos	Dermatitis con hiperqueratosis													x	
	Máculas y pápulas												x		
	Dermatitis pustular														x
	Ictericia			x											
	Edema subcutáneo									x	x		x		
Cavidades	Ascitis	x							x	x					x
	Hidrotórax	x								x		x		x	
	Hidropericardio	x							x	x		x		x	x
Serosas	Peritonitis fibrinosa	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x			x
	Pleuritis fibrinosa	x					x		x						
	Pleuritis fibrosa				x							x			
	Pericarditis fibrinosa						x	x							
	Pericarditis fibrosa		x		x										
Hígado	Hepatitis fibrosa	x				x			x						
	Necrosis hepática			x											
Digestivo	Úlceras gástricas												x		
	Gastritis catarral													x	
	Enteritis catarral		x												
	Enteritis fibrinosa											x		x	x
	Enteritis fibrinonecrótica			x											
Urinario	Nefritis intersticial								x				x		x
Cardiovascular	Hemorragias	x									x				
	Endocardiosis +Quistes													x	
	Cardiomiopatía dilatada+ Necrosis de miocardio								x						
Respiratorio	***BNsup***		x	x		x	x					x		x	
	NI									x	x				x
	BNsup+NI	x						x	x				x		
	BNsup+BNfn				x										
Órganos linfoides	Linfoadenomegalia	x		x			x		x	x	x	x	x		
	Tonsilitis supurativa											x			
	Tonsilitis fibrinonecrótica			x											
Músc-esquel.	Artritis fibrosa		x												
SNC	Congestión en meninges	x					x		x	x	x			x	
	Hemorragias en meninges	x													
	Hemorragias en cerebro y cerebelo								x						

4.1.2.1 LECHONES

N4: Lechón macho de 1,5-2 meses. **N16:** Lechón macho de 1,5-2 meses. Camada de 8 lechones. Pérdida de apetito, retraso en el crecimiento y apatía. Tos y debilidad en las extremidades con incoordinación en los movimientos. Distrés respiratorio y muerte.

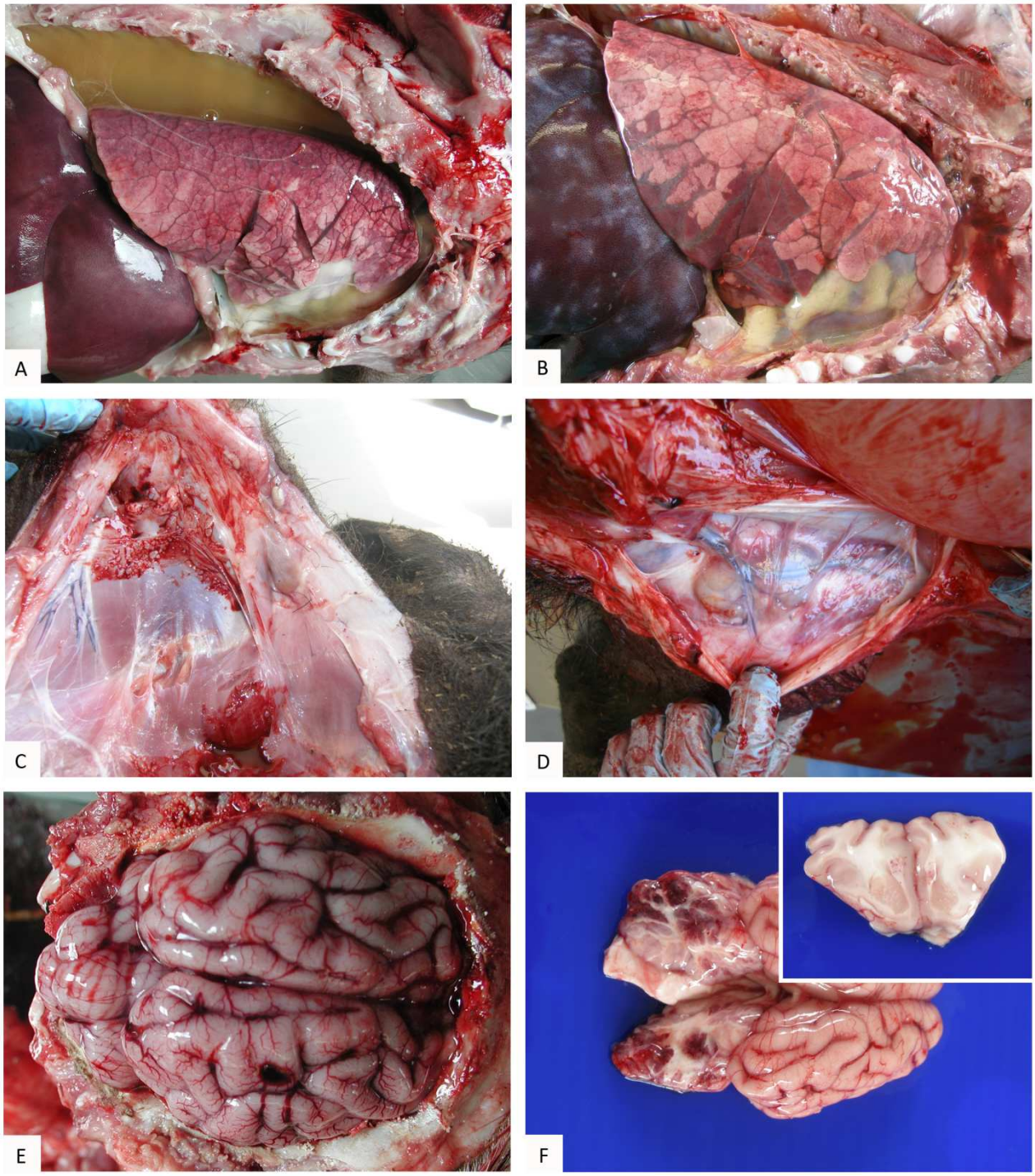


Figura 1: **Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes observadas en los lechones N4 y N16. A. Cavidades y pulmón (N4)**. Moderado a severo hidrotórax. Pleuritis fibrinosa moderada. Bronconeumonía supurativa multifocal y severa neumonía intersticial. Severo edema intersticial. **B. Pulmón e hígado (N16). Pulmón.** Bronconeumonía supurativa, neumonía intersticial difusa y edema intersticial moderado a severo. Pleuritis fibrinosa leve-moderada. **Hígado.** Hepatitis fibrosa multifocal de origen parasitario *(hígado en manchas de leche)*. **C y D. Linfonodos preescapular (N4) e inguinal profundo (N16).** Linfoadenomegalia generalizada de moderada a severa. **E. Meninges (N4).** Congestión severa generalizada y hemorragia focal en hemisferio derecho. **F. SNC (N16).** Hemorragias petequiales y equimosis severa en cerebelo. *Inset. Hemorragias petequiales leves en sustancia blanca de cerebro.*

N7: Lechón macho de 1,5-2 meses.

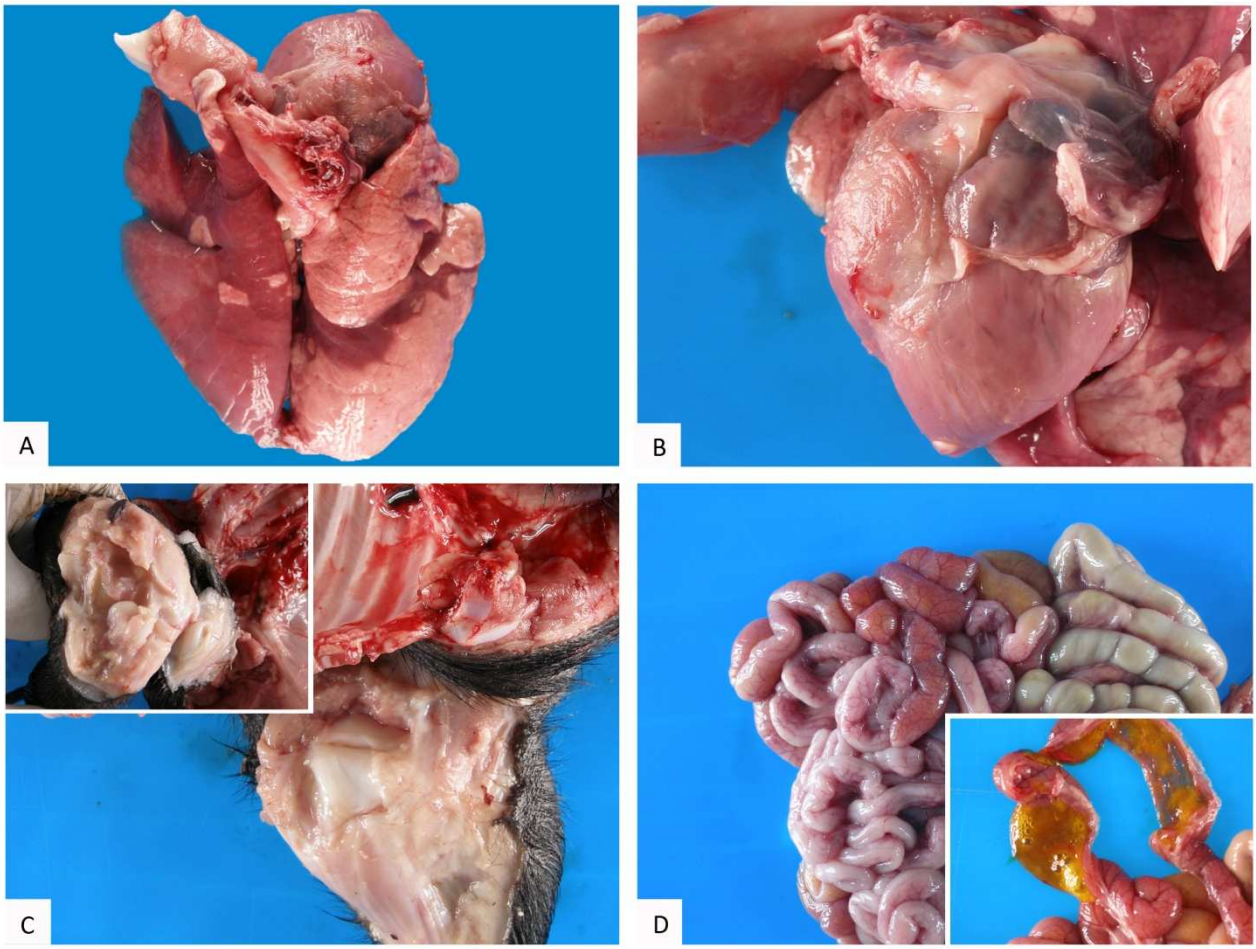


Figura 2: Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes observadas en el lechón N7. A. Pulmones. Atelectasia difusa severa del pulmón izquierdo. Bronconeumonía supurativa moderada en lóbulo caudal derecho. B. **Corazón.** Pericarditis fibrosa moderada. **C. Articulaciones.** Artritis fibrosa en cápsula articular de codo izquierdo y rodilla derecha (*Inset*). **D. Intestino.** Enteritis catarral moderada a severa en yeyuno. *Inset. Apertura de yeyuno.*

N8: Lechón hembra de 1,5 meses. Letargia, deshidratación, hipotermia, caquexia, vómito amarillo, exudado nasal mucopurulento, ictericia, pelo hirsuto, estertores respiratorios y muerte.

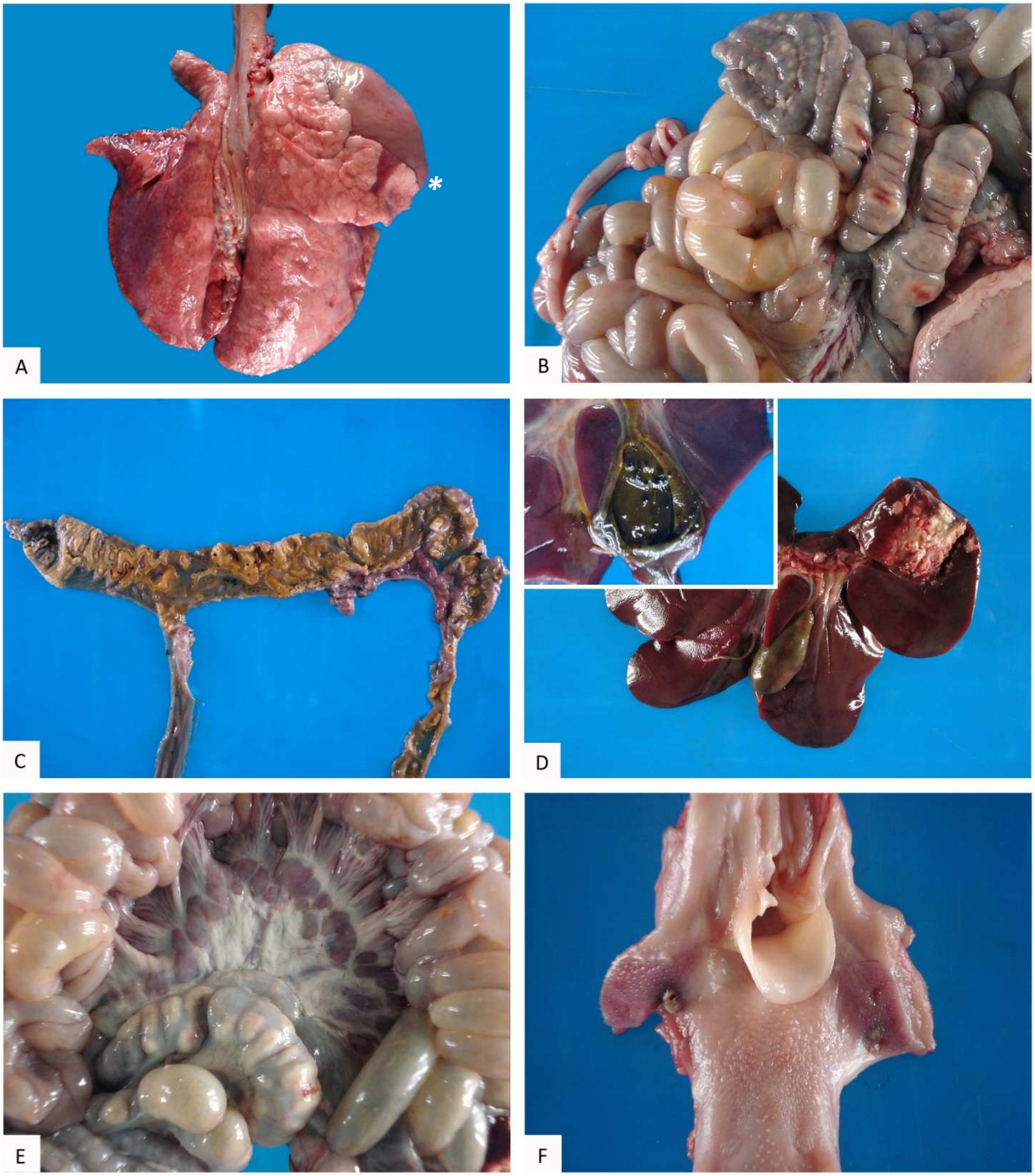


Figura 3: Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes observadas en el lechón N8. A Pulmón: Bronconeumonía supurativa focal leve en lóbulo medio derecho *(*)*. **B y C. Intestino grueso (ciego y colon).** Tiflitis y colitis fibrinonecrótica difusa segmental severa. Contenido biliar de aspecto arenoso. (B, serosa. C, mucosa). **D. Hígado.** Necrosis hepática severa, multifocal coalescente, localmente extensa. Estasis de vesícula biliar. *Inset. Edema de pared vesical leve y contenido biliar arenoso*. **E. Linfonodos mesentéricos.** Linfoadenomegalia severa. **F. Tonsila.** Tonsilitis fibrinonecrótica focal bilateral.

N9: Lechón hembra de 1,5-2 meses.

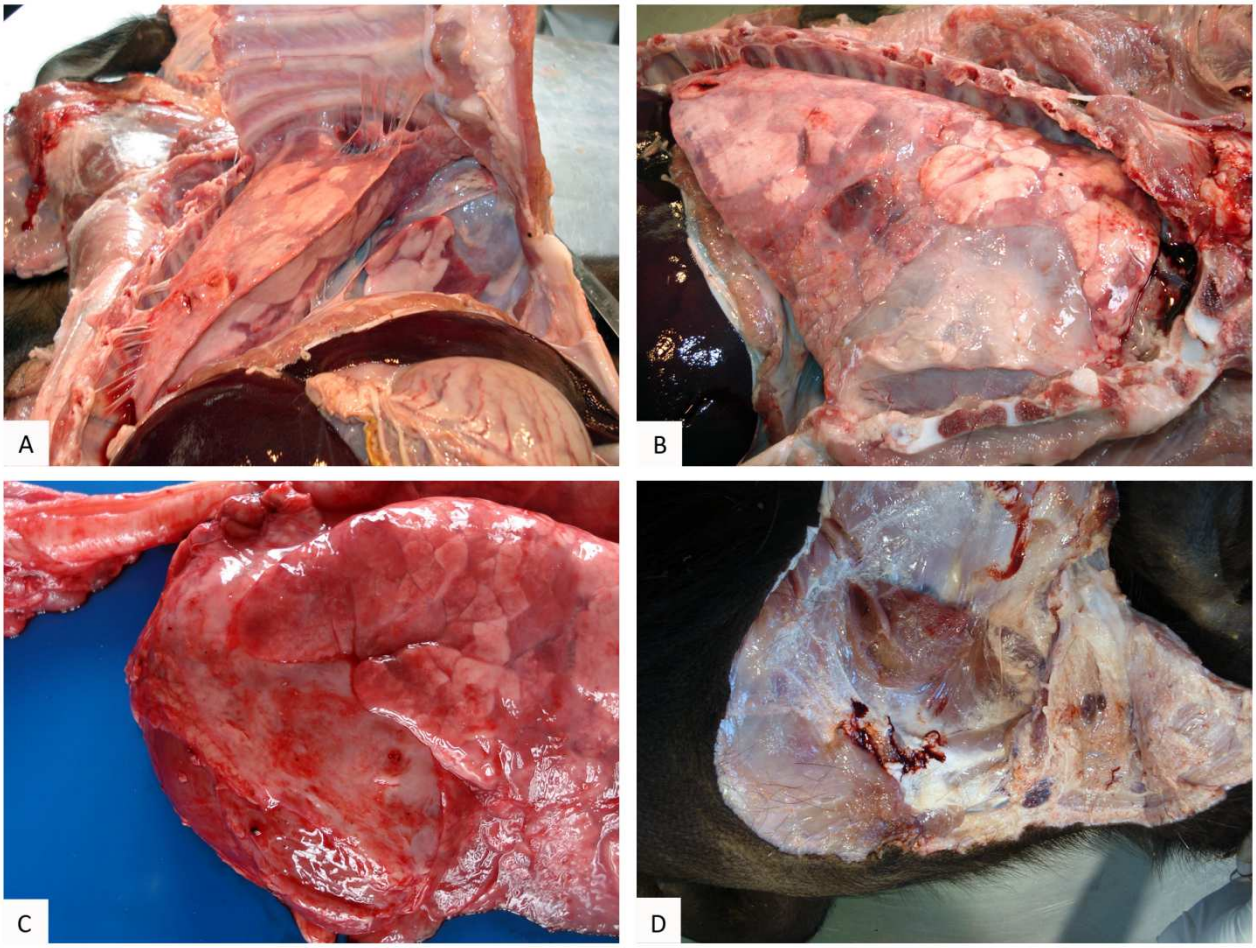


Figura 4: Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes observadas en el lechón N9. A. Cavidad torácica. Pleuritis fibrosa multifocal moderada-severa. **B. Pulmón.** Bronconeumonía supurativa subaguda-crónica en lóbulos craneal, medio y caudal derecho. Bronconeumonía fibrinonecrótica focal aguda-subaguda en lóbulo caudal derecho. **B y C.** Pericarditis fibrosa moderada-severa. Bronconeumonía supurativa en lóbulo craneal izquierdo (porción craneal y caudal) y lóbulo caudal. **D. Linfonodos.** Linfoadenomegalia moderada de linfonodo preescapular.

N10, N11 y N12. Lechones hembras (N10 y N11) y macho (N12) de 2,5 meses.

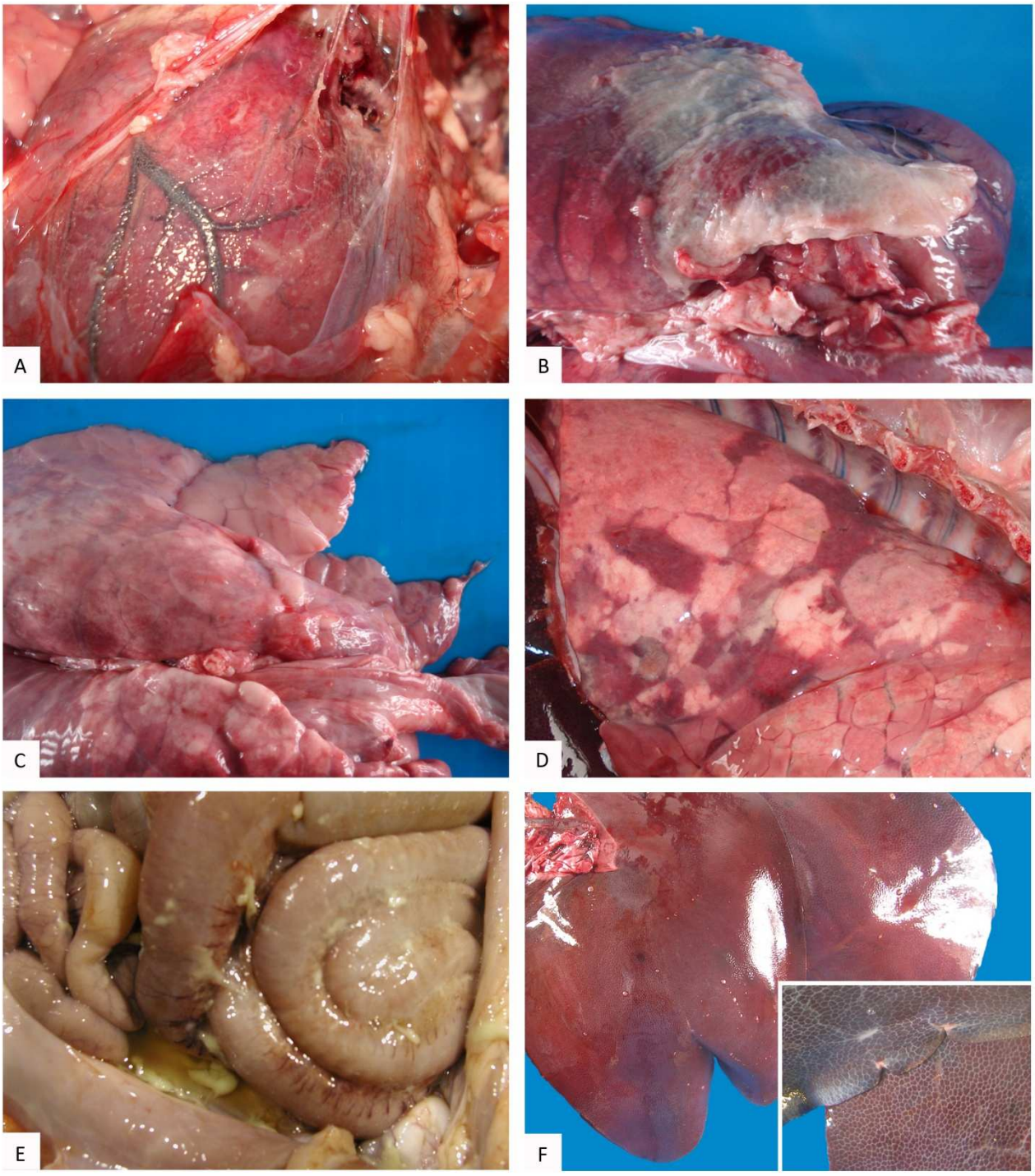


Figura 5: **Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes observadas en los ejemplares N10, N11 y N12. A. Corazón y saco pericárdico (N12).** Pericarditis fibrinosa moderada. **B. Pulmón (N11).** Pleuritis fibrinosa moderada. **C. Pulmón (N10).** Bronconeumonía supurativa crónica. **D. Pulmón (N12).** Bronconeumonía supurativa subaguda-crónica y neumonía intersticial. **E. Cavidad abdominal (N11).** Peritonitis fibrinosa moderada. **F. Hígado (N10).** Moderada congestión hepática. *Inset. Hepatitis fibrosa leve*.

N17: Lechón hembra de 1,5 meses que presentó muerte súbita.

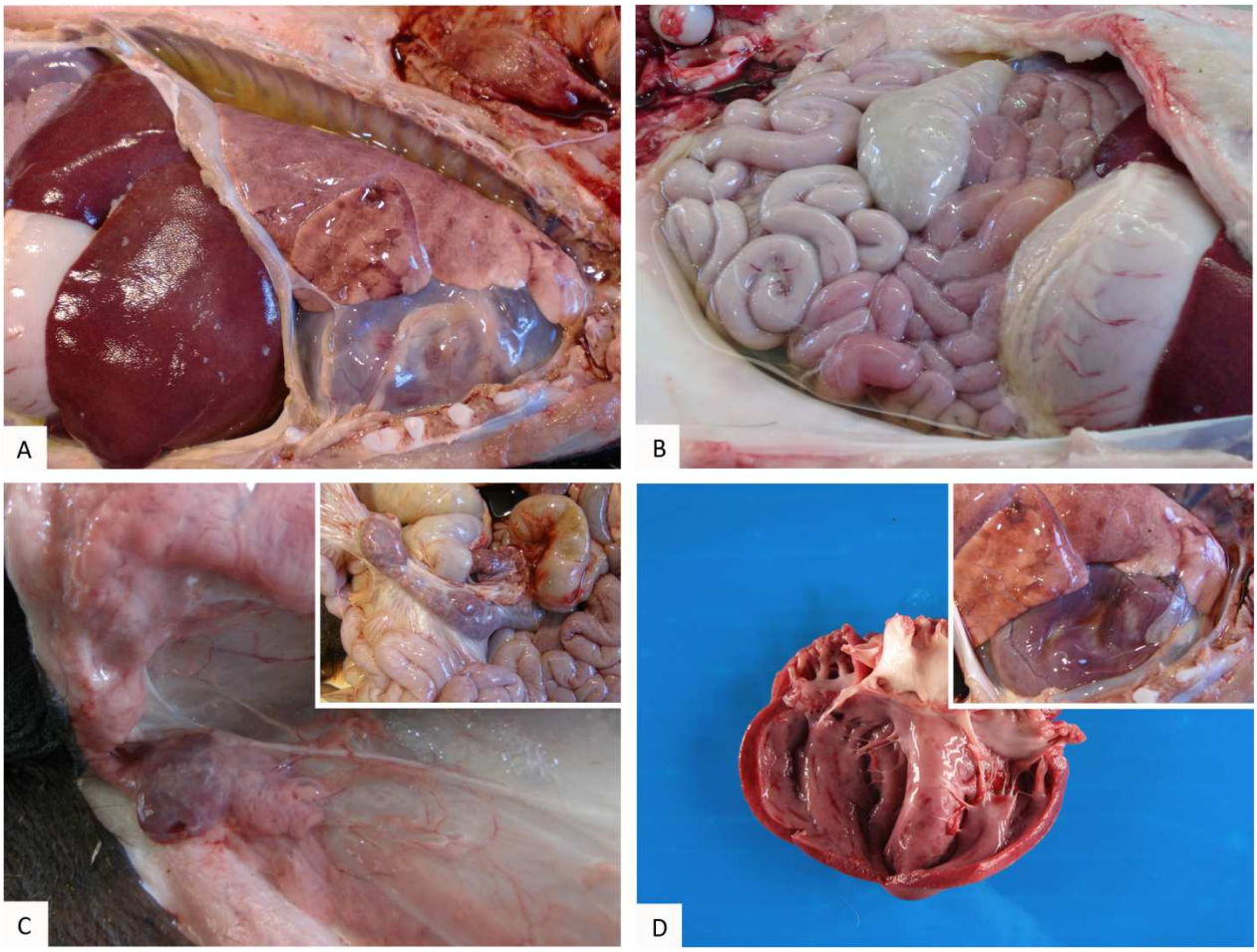


Figura 6: Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes observadas en el ejemplar N17. A. Cavidad torácica. Hidrotórax leve. **Pulmón.** Neumonía intersticial leve. **Hígado.** Congestión severa. Hepatomegalia. **B. Cavidades.** Ascitis y peritonitis fibrinosa leve. **C. Tejido subcutáneo.** Edema subcutáneo moderado. **Linfonodos.** Linfoadenomegalia moderada-severa de LNs inguinal superficial y mesentérico *(Inset)*. **D. Corazón.** Cardiomiopatía dilatada. *Inset. Necrosis de miocardio multifocal.*

N22 y N23. Lechones machos de 2,5-3,5 meses procedentes de un explotación de cerdo híbrido (ciclo cerrado 150 reproductoras) con ejemplares CNC. Lechones híbridos y CNC con sintomatología nerviosa, pedaleo, rigidez en cuello, en ocasiones con edema en párpados. Muerte a los 2-3 días. Animales vacunados de Circovirus, PRRSv controlado e indemne de Aujeszky. *Explotación no incluida en Estudio serológico (Estudio 3).*

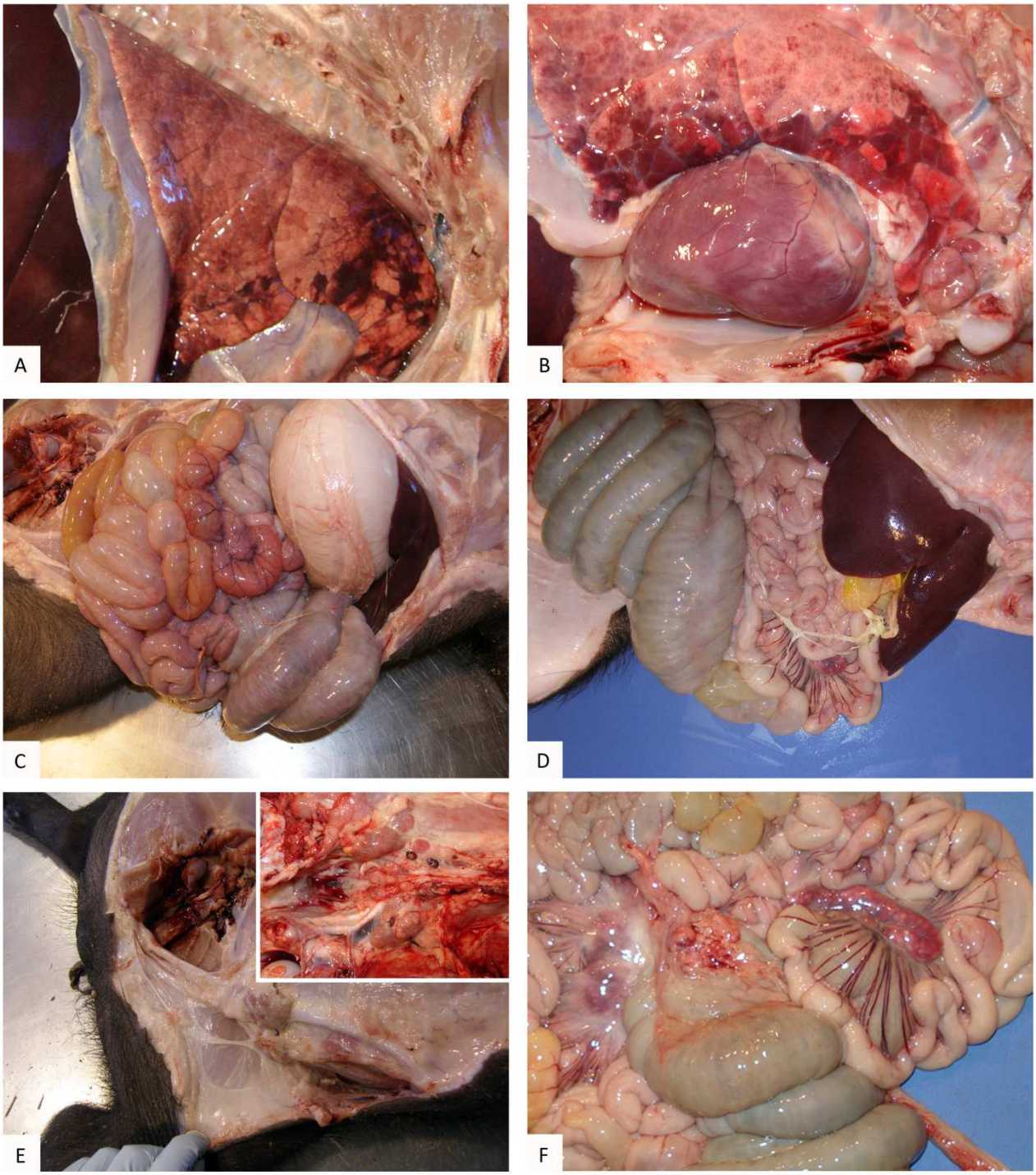


Figura 7: **Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes observadas en los ejemplares N22 y N23. A y B. Pulmón. A (N22).** Neumonía intersticial aguda leve. **B (N23).** Bronconeumonía supurativa aguda-subaguda moderada. **C (N22) y D (N23). Cavidad abdominal.** Peritonitis fibrinosa leve-moderada. **E (N22).** Leve edema subcutáneo. Linfoadenomegalia marcada de LNs inguinal superficial. *Inset. Linfoadenomegalia marcada de LNs inguinales profundos*. **F (N23).** Linfoadenomegalia marcada en LNs mesentéricos.

4.1.2.2 ANIMALES DE CEBO

N5: Animal de cebo de 7 meses. Presentó debilidad en extremidades posteriores, convulsiones y vómitos en las últimas 24hs.

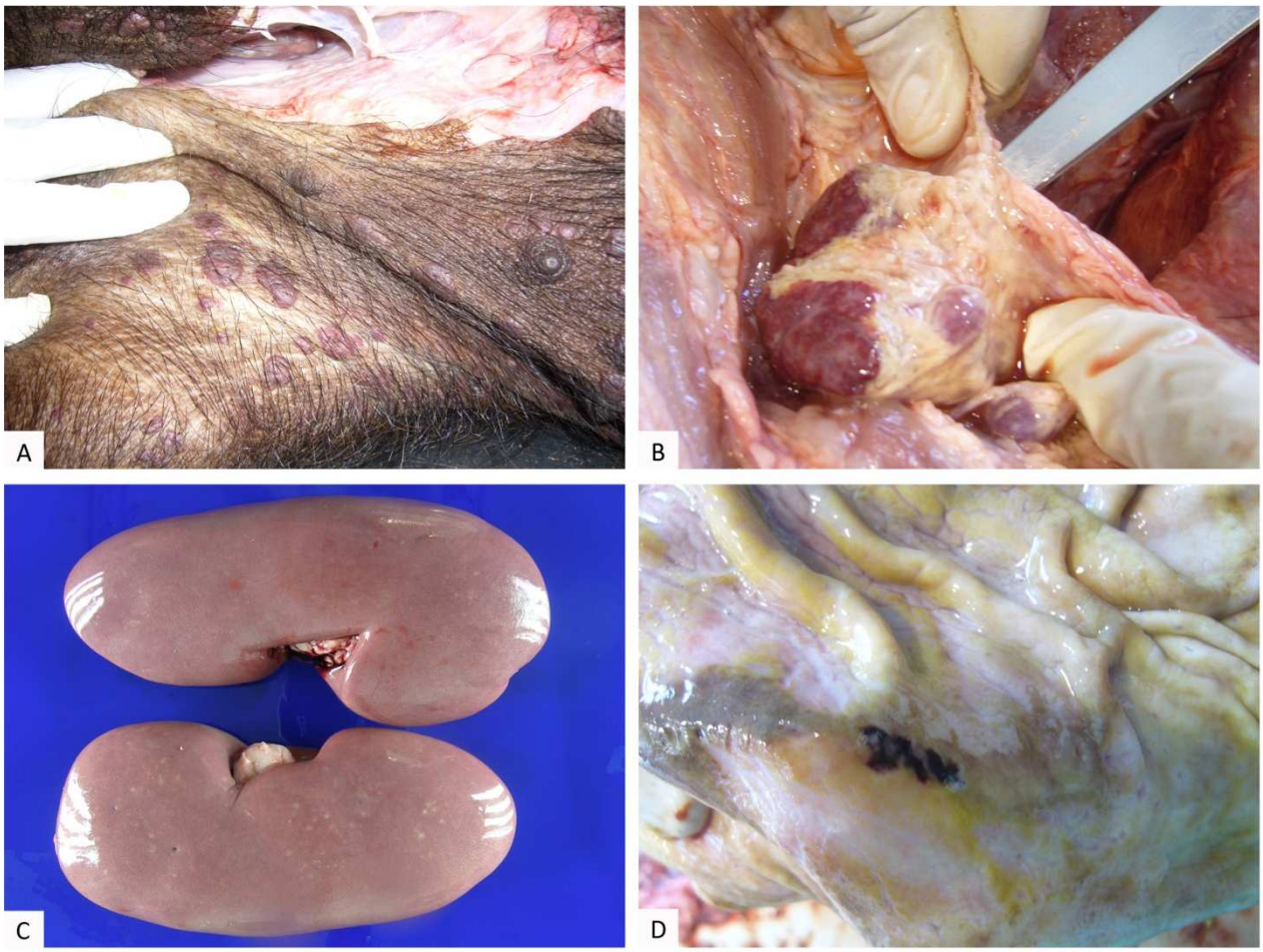


Figura 8: **Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes observadas en el ejemplar N5. A. Piel (abdomen y extremidades posteriores).** Máculas multifocales **B. LN inguinal superficial.** Linfoadenomegalia marcada y leve-moderada congestión. **C. Riñón. N**efritis intersticial multifocal diseminada. **D. Estómago.** Úlcera gástrica subaguda-crónica en pars glandular.

4.1.2.3 REPRODUCTORES

N13. Reproductor macho, mayor de 1 año con cuadro de caquexia y lesiones costrosas en piel de flancos y cuello.

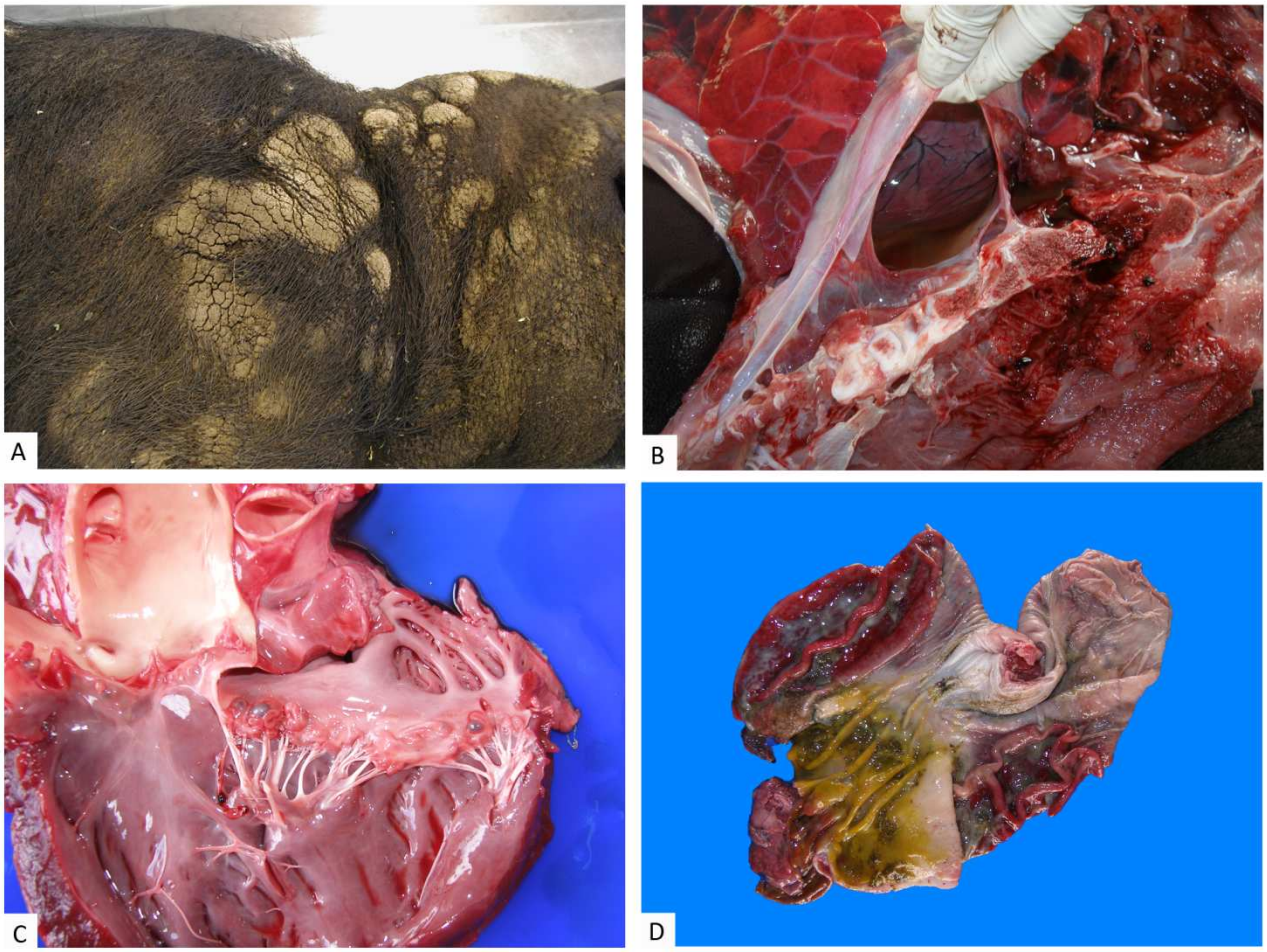


Figura 9: **Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes observadas en el ejemplar N13. A. Piel (cuello).** Dermatitis hiperplásica con hiperqueratosis. **B. Pulmón y saco pericárdico.** Bronconeumonía supurativa aguda leve y moderado hidropericardio. *Inset. Detalle de la lesión en lóbulo medio derecho*. **C. Corazón (válvula mitral).** Endocardiosis moderada-severa y quistes hemáticos. **D. Estómago.** Gastritis catarral.

N14. Reproductor macho >1 año con adelgazamiento progresivo.

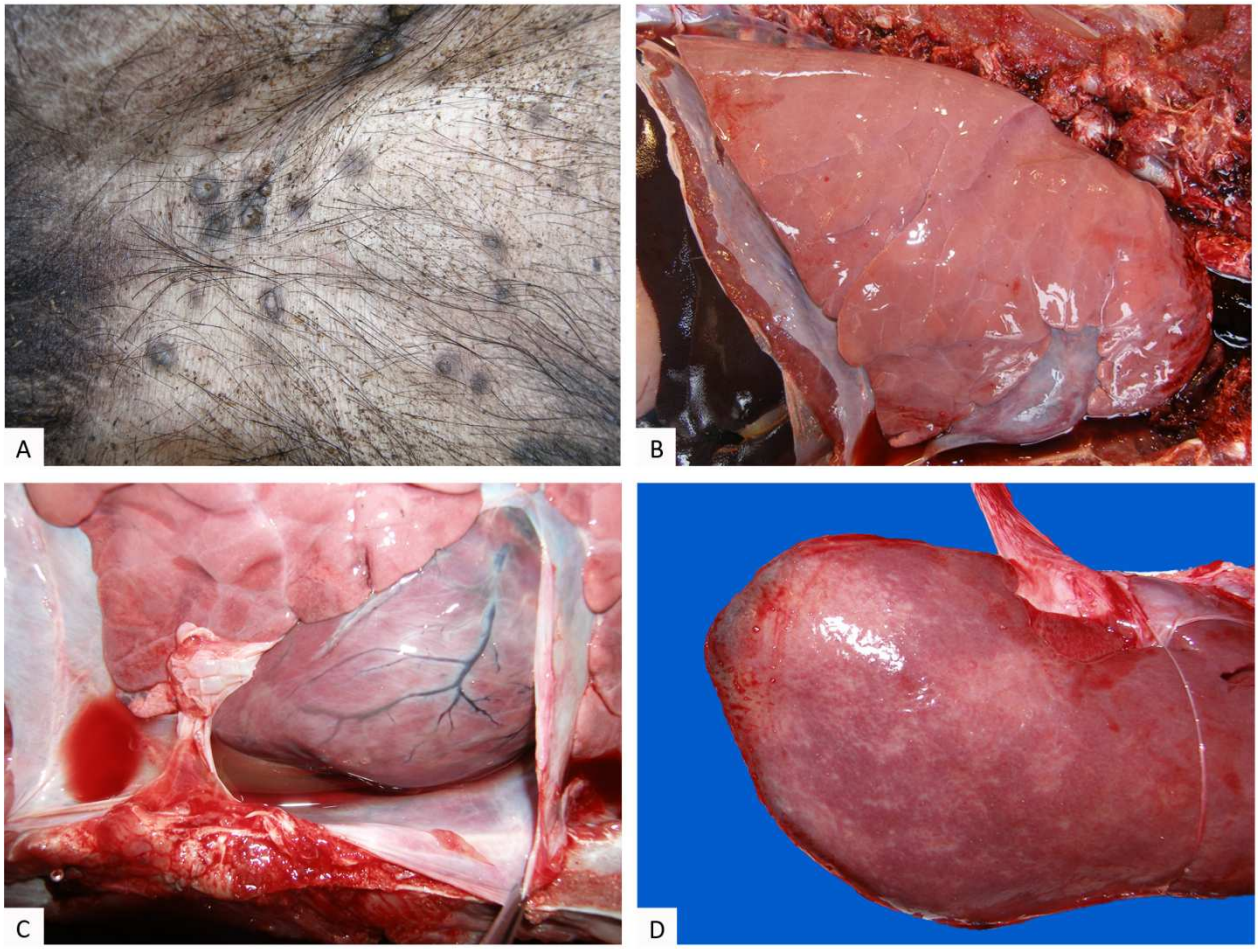


Figura 10: **Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas más relevantes observadas en el ejemplar N14. A Piel (abdomen, región inguinal).** Dermatitis pustular multifocal. **B. Pulmón** Neumonía intersticial difusa. **C. Cavidades.** Hidropericardio leve-moderado. **D. Riñón.** Nefritis *intersticial crónica multifocal localmente extensiva*

4.1.3 DESCRIPCIÓN DE LESIONES MICROSCÓPICAS Y DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO

Con el objetivo de profundizar en el estudio de las enfermedades respiratorias que pudieran estar afectando a esta raza, se analizaron los hallazgos microscópicos encontrados en los animales que, durante la realización de la necropsia presentaban lesiones macroscópicas de tipo inflamatorio en el **sistema respiratorio** (14).

Así, se observaron lesiones microscópicas a nivel **cutáneo** en el 29% (4) de los animales analizados; siendo un 7% (1) lechones, un 7% (1) animales de cebo y un 14% (2) reproductores. En **serosas de los órganos**, un 57% (8) presentaron lesiones, siendo lechones todos los animales afectados. Un 78% (11) de los animales presentaban el **hígado** afectado; siendo un 64% (9) lechones, un 7% (1) animales de cebo y un 7% (1) reproductores. A nivel digestivo, también se observaron lesiones microscópicas en estómago y/o intestino en un 86% (12) de los casos; siendo lechones un 64% (9), animales de cebo un 7% (1) y reproductores el 14% (2). Por su parte, a nivel urinario, se apreció presencia de lesiones microscópicas en **riñón** en el 64% (9) de los animales; donde un 50% (7) eran lechones, un 7% (1) animales de cebo y el 7% (1) restante, reproductor. A nivel cardiovascular, y concretamente en el corazón, el 36% (5) de los animales presentaron lesiones microscópicas. De estos animales, un 22% (3) eran lechones, un 7% (1) animales de cebo y el otro 7% (1) reproductores. De todos los órganos evaluados, el 100% (14) de los animales presentaron lesiones microscópicas **a nivel pulmonar** viéndose afectados la totalidad de los lechones, cebo y reproductores. Los **órganos hemolinfoides** (bazo, LNs, timo, tonsila o placas de Peyer), también presentaron alguna lesión o lesiones combinadas en el 100% de los animales. Por otro lado, a nivel del **SNC**, fue posible apreciar lesiones microscópicas en meninges y/o encéfalo en un 36% (5) de los animales; donde un 29% (4) fueron lechones, y el 7% (1) restante fueron animales de cebo. Finalmente, un 7% (1) de los animales presentaron lesiones microscópicas a nivel de **articulaciones**, observándose en cápsula articular (Gráfico 3).

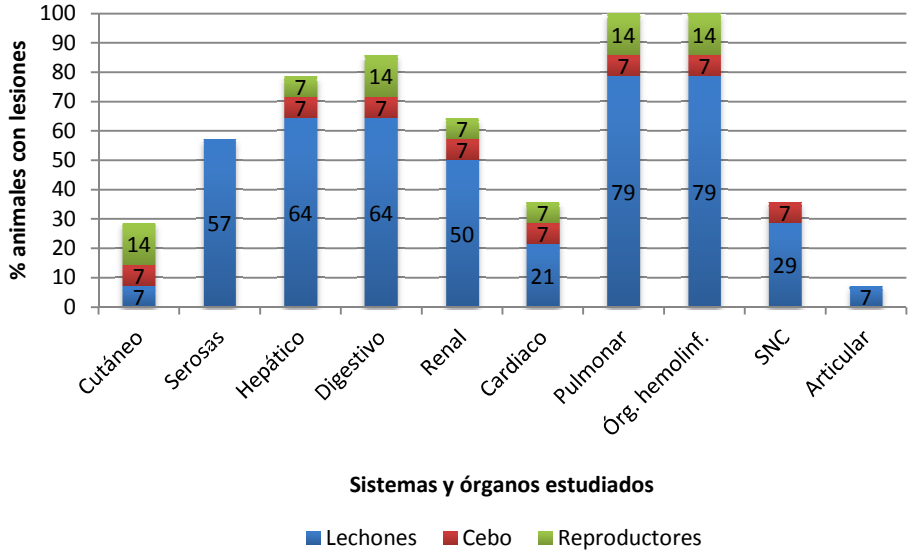


Gráfico 3: Sistemas y órganos con lesiones microscópicas. Porcentaje de animales, clasificados según su rango de edad, que presentaron algún tipo de lesión macroscópica en los distintos sistemas inspeccionados.

A nivel **cutáneo** se observaron lesiones en ***epidermis***, caracterizadas por la presencia de pústulas intraepidérmicas con severo infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear eosinofílico y detritus celulares *(dermatitis pustular)* con estructuras parasitarias compatibles con *Sarcoptes scabiei* en estrato córneo de la epidermis y paraqueratosis ocasional (Fig. 32B, N13 y Fig. 28D, N5). Además, se observó presencia de infiltrado inflamatorio en epidermis con pérdida de continuidad y exudado inflamatorio polimorfonuclear y detritus celulares *(dermatitis ulcerativa).*

En ***dermis***, los principales hallazgos microscópicos observados fueron: la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear eosinofílico perivascular y/o intersticial *(dermatitis eosinofílica)* (Fig. 33C, N14). Otra lesión observada en dermis fue daño de pared de los vasos sanguíneos, con infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear, exudado fibrinoide y necrosis de capilares y arteriolas *(vasculitis necrotizante)* con necrosis multifocales de la dermis, asociadas a los procesos de vasculitis (Fig. 28A y B, N5). También se observó severo infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear y mononuclear intersticial en dermis, extendiéndose hasta epidermis, asociado a severa destrucción de la estructura normal de los folículos pilosos *(furunculosis)* (Fig. 33D, N14). *Así, se observó dermatitis pustular parasitaria en el 14% (2) de los animales, asociado a paraqueratosis en un caso (N13) y dermatitis ulcerativa en un 7% (1). En un 21% (3) de los casos se observó dermatitis eosinofílica perivascular o difusa. Finalmente, un 7% (1) presentó además severa vasculitis necrotizante (Tabla 14 y 15).*

A nivel de **serosa** se observó en ***pleura***, la presencia de exudado fibrinoso e infiltrado inflamatorio polimorfonuclear acompañado en algunos casos por dilatación de vasos sanguíneos *(pleuritis fibrinosa/fibrinopurulenta),* y en casos subagudos-crónicos acompañados de discreta proliferación de tejido conectivo (Fig. 19B, N11). En casos crónicos el exudado fibrinoso fue sustituido por moderada a severa proliferación de tejido conectivo *(pleuritis fibrosa)* (Fig. 20D, N12). En ***pericardio*** también fue posible observar la presencia de exudado fibrinoso acompañado de infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear *(pericarditis fibrinosa/fibrinosupurativa)* con escasa proliferación de tejido conectivo en caso subagudos crónicos (Fig. 19C, N11). En casos crónicos se observó moderada a severa proliferación de tejido conectivo acompañado de infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario *(pericarditis fibrosa)* (Fig. 17C, N9). En cápsula ***hepática*** también fue posible observar exudado fibrinoso acompañado por infiltrado inflamatorio polimorfonuclear neutrofílico *(perihepatitis fibrinopurulenta)* (Fig. 19D, N11). Además, se observó exudado fibrinoso e infiltrado inflamatorio en serosa de estómago e intestino *(serositis fibrinosa)* (Fig. 17E y F, N9) y en mesenterio *(peritonitis fibrinosa)* (Fig. 19E, N11). *Así, se observó en cavidad torácica, presencia de pleuritis fibrinosa/fibrinopurulenta en un 14% (2) de los animales, pleuritis fibrosa en un 29% (4), pericarditis fibrinosa/fibrinopurulenta en un 14% (2), pericarditis fibrosa en un 21% (3). En cavidad abdominal fue posible encontrar perihepatitis fibrinopurulenta en un 14% (2), serositis fibrinosa en estómago e intestino de un 7% (1) y peritonitis fibrinosa en otro 14% (2) (Tabla 14 y 15).*

A nivel **hepático**, los hallazgos microscópicos observados fueron la proliferación de tejido conectivo a nivel de septos interlobulillares y espacios portas *(hepatitis fibrosa)*, en ocasiones acompañado por infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear eosinófilos *(hepatitis fibrosa eosinofílica)* (Fig. 26D, N23). En un algunos casos, se observaron lesiones multifocales de necrosis de hepatocitos a nivel centrolobulillar con congestión severa en sinusoides hepáticos *(necrosis hepática centrolobulillar)* (Fig. 24D, N17) y ocasionalmente se observó en un animal, necrosis hepática con severo infiltrado inflamatorio mixto de tipo polimorfonuclear neutrófilos y mononuclear macrofágico, con detritus celulares en la región central *(hepatitis necrótica)* (Fig. 16E y F, N8). También se observó en algunos casos, a nivel periportal, la presencia de infiltrado inflamatorio mononuclear linfohistiocítico

(hepatitis linfohistiocítica) con células gigantes multinucleadas aisladas (Fig. 29E y F, N5) y en un caso infiltrado mononuclear linfocítico en espacios porta acompañada de moderada-severa congestión y proliferación de tejido conectivo *(hepatitis linfocítica periportal)*. *El 21% (3) de los animales presentó hepatitis fibrosa, en un 21% (3) se observó necrosis hepática centrolobulillar y en un 7% (1) hepatitis necrótica. En otro 21% aparecieron lesiones de hepatitis linfohistiocíticas y en un 7% (1) hepatitis linfocítica periportal subaguda crónica (Tabla 14 y 15).*

En el **sistema digestivo** se apreciaron lesiones de tipo inflamatorio a nivel de estómago y con mayor frecuencia a nivel intestinal.

A nivel **gástrico** se observó con frecuencia, infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear eosinofílico *(gastritis eosinofílica)* o mononuclear linfoplasmocitario *(gastritis linfoplasmocitaria)* (Fig. 24I, N17), observándose también en algún caso, la presencia de células inflamatorias, epiteliales, moco y fibrina en la superficie gástrica *(gastritis fibrinosa)*. También se pudo apreciar áreas multifocales de necrosis de la mucosa gástrica, con pérdida del epitelio *(gastritis ulcerativa)* acompañado, en un caso, por áreas multifocales de congestión severa a nivel de mucosa y submucosa, así como por fibrina y células epiteliales e inflamatorias en la luz (Fig. 31A, N13). *Así, en un 7% (1) se observó gastritis linfoplasmocitaria, un 14% (2) de los animales presentaron gastritis eosinofílica, un 7% (1) gastritis fibrinosa y otro 14% (2) presentó gastritis ulcerativa (Tabla 14 y 15).*

A nivel **intestinal** se observó infiltrado inflamatorio principalmente en mucosa/submucosa, de tipo polimorfonuclear eosinofílico *(enteritis eosinofílica)* (Fig. 33F, N14) o de tipo mononuclear linfoplasmocitario *(enteritis linfoplasmocitaria)* (Fig. 25E, N22) o linfohistiocítico *(enteritis linfohistiocítica)* (Fig. 29D, N5). En ocasiones, este infiltrado se vio acompañado por la presencia de elevado contenido seroso o mucoso (intestino delgado o grueso) *(enteritis catarral)* (Fig. 14F, N7), fibrina, epitelio desprendido e incluso bacterias en la luz intestinal con acortamiento de vellosidades intestinales (enteritis fibrinonecrótica*)*. En uno de los animales se observó una severa necrosis afectando a mucosa y submucosa y extendiéndose hasta la capa muscular a nivel de intestino grueso (Fig. 16C, N8). En otros casos sólo se observaron procesos de necrosis de leve a moderado sin presencia de exudado fibrinoso *(enteritis necrótica)* (Fig. 24J, N17). *Así, de los animales estudiados, se observó enteritis eosinofílica en un 21% (3), enteritis linfoplasmocitaria o linfohistiocítica en un 29% (4), enteritis catarral en un 14% (2), fibrinonecrótica en otro 14% (2) y necrótica en un 14% (2) (Tabla 14 y 15).*

A nivel **renal**, las lesiones microscópicas observadas con mayor frecuencia en corteza, médula y/o pelvis renal fue: la presencia de infiltrado inflamatorio principalmente de tipo mononuclear linfocítico/linfoplasmocitario de distribución multifocal a nivel intersticial *(nefritis intersticial)* (Fig. 28F, N5). También se observó moderada-severa proliferación de tejido conectivo en corteza a nivel intersticial con atrofia de túbulos renales y presencia de infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear linfoplasmocitario multifocal *(nefritis intersticial crónica)* (Fig. 33E, N14). En un caso se observó severa presencia de fibrina, sangre e infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear linfocítico en espacio glomerular de distribución difusa *(glomerulonefritis fibrinonecrotizante)* (Fig. 28E, N5) conjuntamente con nefritis intersticial linfoplasmocitaria multifocal y cambios degenerativos con material proteináceo en la luz de los túbulos renales y glóbulos hialinos intracitoplasmáticos en epitelio tubular *(tubulonefrosis)* (Fig. 28E y F, N5). En el total de animales estudiados, se observó nefritis intersticial en un 64% (8), asociada a fibrosis renal en uno 7% (1) y combinada con glomerulonefritis fibrinonecrotizante y tubulonefrosis en otro 7% (1) *(Tabla 14 y 15).*

A nivel **cardiaco**, las lesiones más frecuentes fueron infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear neutrofílico en miocardio subepicárdico *(miocarditis supurativa subepicárdica)* (Fig. 19C *Inset*, N11) o infiltrado multifocal de tipo mononuclear linfocítico/macrofágico *(miocarditis no supurativa)*, asociado ocasionalmente con áreas de necrosis de miocardiocitos (Fig. 24C, N17) También fue posible observar cambios degenerativos en el endocardio caracterizados por el engrosamiento de éste a nivel valvular por la proliferación de fibroblastos *(endocardiosis). Así, fue posible observar miocarditis supurativa subepicardica asociada a proceso de pericarditis fibrinopurulenta en un 7% (1), miocarditis no supurativa en un 29% (4) de los casos, asociada a necrosis de miocardio en un 7% (1). Otro 7% (1). Finalmente, se observó endocardiosis en otro 7% (1) (Tabla 14 y 15).*

A nivel **pulmonar,** las lesiones microscópicas observadas con mayor frecuencia fueron: la presencia de infiltrado inflamatorio en la luz de bronquios, bronquiolos y alveolos, constituido mayoritariamente por polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, con presencia, en ocasiones, de leucocitos degenerados *(bronconeumonía purulenta)* (Fig. 19A, N11), y en los casos más severos fue posible observar además la presencia de exudado fibrinoso (membranas hialinas) en la luz alveolar *(bronconeumonía fibrinopurulenta)* (Fig. 15A, N8). Este patrón de bronconeumonía se vio acompañado en uno de los animales por áreas multifocales de severa congestión y hemorragia con necrosis de leucocitos *(bronconeumonía necróticohemorrágica)* (Fig. 17B, N9). Otras lesiones asociadas a los procesos de bronconeumonía fue la hiperplasia del BALT y el engrosamiento de las paredes alveolares por la hiperplasia de neumocitos tipo II *(neumonía broncointersticial)* (Fig. 18A y B, N10). Además se pudo observar engrosamiento de las paredes alveolares por la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear neutrofílico en los casos más agudos o mononuclear linfoplasmocitarias, así como la hiperplasia de neumocitos tipo II *(neumonía intersticial)* (Fig. 15D, N8). En procesos de neumonía intersticial más crónicas se observó además exudado inflamatorio mononuclear linfocítico, macrófagos alveolares espumosos y presencia de células gigantes multinucleadas (sincitios) en la luz de las vías aéreas (Fig. 11E *Inset*, N4 y Fig. 27C, N5). Así mismo, se observó asociado a *neumonía intersticial*, la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear linfoplasmocitario en pared bronquial afectando a la lámina propia, con necrosis y pérdida de epitelio respiratorio, así como severo exudado inflamatorio de tipo mononuclear linfohistiocítico y polimorfonuclear neutrófilos, moco y epitelio desprendido en vías aéreas dando lugar a procesos de bronquitis (Fig. 27D, N5). Finalmente, en uno de los animales se observó severo trasudado en la luz alveolar *(edema)* y una lesión focal de proliferación de tejido conectivo *(fibrosis)* con presencia de luces vasculares (Fig. 33A, N14).

Se observó la presencia de lesiones puras de bronconeumonía purulenta en un 14% (2), neumonía broncointersticial en un 21% (2) y procesos de neumonía intersticial en un 7% (1). Además, un 36% (5) de los animales presentaron lesiones de neumonía intersticial asociadas a neumonía broncointersticial, en un 7% (1) de los casos a bronconeumonía purulenta y en un 7% (1) a bronconeumonía fibrinopurulenta. Otras lesiones que se observaron de forma combinada en otro 7% (1) de los animales fueron procesos de neumonía broncointersticial y bronconeumonía necroticohemorrágica (Tabla 14 y 15).

A nivel de los **órganos hemolinfoides** se observó lesiones en bazo, linfonodos, timo y en tejido linfoide asociado a las mucosas (tonsila y placas de Peyer)

A nivel ***esplénico***, fue posible observar pérdida de celularidad a nivel de folículos linfoides y vainas linfoides periarteriolares *(depleción linfoide)* (Fig. 12D, N4; Fig. 22D, N5). Algunos animales presentaron infiltrado inflamatorio mononuclear difuso de células histiocíticas *(histiocitosis)* (Fig. 29A, N5), donde fue frecuente observar la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos así como

infiltrado de células gigantes multinucleadas (sincitios). En algunos animales se observó infiltrado inflamatorio mononuclear histiocítico y abundante presencia de megacariocitos (Fig. 14C, N7). *Así, se observó depleción linfoide esplénica en un 50% (7) de los animales; histiocitosis, acompañada en ocasiones por sincitios, en un 29% (4) (Tabla 14 y 15).*

A nivel de ***linfonodos,*** también fue posible observar depleción linfoide e histiocitosis. Otro hallazgo histopatológico, observado con frecuencia fue: el aumento del número de folículos linfoides y de centros germinativos, con un incremento en el número de células de naturaleza linfoide, tanto a nivel de folículos linfoides como en tejido difuso *(hiperplasia linfoide)* (Fig. 26C, N23). En algunos casos se observó infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear neutrofílico *(linfadenitis purulenta)* o eosinofílico *(linfadenitis eosinofílica).* En un caso fue posible observar áreas de necrosis con infiltrado inflamatorio y exudado fibrinoso *(linfadenitis fibrinonecrótica)*.

Así, en linfonodos, un 29% (4) de los animales presentó depleción linfoide, un 14% (2) presentó histiocitosis, un 50% (7) presentó hiperplasia linfoide a nivel de folículos y/o tejido difuso, y en menor medida, un 7% (1) presentó linfadenitis purulenta, otro 7% (1) linfadenitis eosinofílica, y finalmente, en otro 7% (1) se observó linfadenitis fibrinonecrótica (Tabla 14 y 15).

En ***tonsila*** también se observó depleción linfoide e histiocitosis (Fig. 12C, N4) o hiperplasia linfoide. Además, otros hallazgos fueron: la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear neutrofílico *(tonsilitis purulenta)*, ocasionalmente con áreas de necrosis *(tonsilitis necrótica)* y exudado fibrinoso *(tonsilitis fibrinonecrótica).* Así, un 14% (2) presentó depleción linfoide en tonsila, uno de ellos (7%, 1) presentado además histiocitosis con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos. Otro 14% (2) mostró hiperplasia linfoide. *La tonsilitis purulenta se observó en un 14% (2) de los animales, la tonsilitis necrótica estuvo presente en un 7% (1) y en otro 7% (1) se observó tonsilitis fibrinonecrótica (Tabla 14 y 15).*

En ***timo*** se observó histiocitosis a nivel medular, caracterizada por la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear histiocítico con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos y abundante presencia de células gigantes multinucleadas (sincitios) (Fig. 12E, N4; Fig. 22E, N16). *Estas lesiones se observaron en un 14% (2) de los animales (Tabla 14 y 15).*

Finalmente, en ***placas de Peyer*** también se observó depleción linfoide e histiocitosis con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos y presencia de células gigantes multinucleadas (sincitios) (Fig. 12F, N4; Fig. 22F, N16). *La depleción linfoide fue observada en un 21% (3) y la histiocitosis en un 14% (2) de los animales estudiados (Tabla 14 y 15).*

A nivel **articular**, se observó engrosamiento a nivel de la membrana sinovial debido a la proliferación de sinoviocitos y de tejido fibroso, con infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear linfoplasmocitario y exudación de fibrina, escasos neutrófilos y presencia de bacterias *(artritis fibrinosa subaguda-crónica)* (Fig. 14A y B, N7). *Esta lesión se observó en un 7% (1) de los animales (Tabla 14 y 15).*

En **SNC** se observó, a nivel de ***meninges,*** la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear linfocítico, linfocitoplasmático y/o macrofágico de distribución perivascular o difusa *(meningitis no supurativa)* (Fig. 17G, N9; Fig. 30A, N5). A nivel de ***encéfalo,*** el hallazgo histopatológico más frecuentemente observado fue la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear linfocítico *(encefalitis no supurativa)* (Fig. 23C, N16) o polimorfonuclear neutrofílico *(encefalitis supurativa)*. El infiltrado inflamatorio a nivel del parénquima nervioso tuvo una distribución predominantemente perivascular. Además, tanto en meninges como en encéfalo fue posible observar

vasculitis (Fig. 13C, N4). También se observaron cambios vasculares, como edema y hemorragias perivasculares (Fig. 18H, N9) o difusas, afectando áreas más extensas en parénquima nervioso (Fig. 23D y F, N16), tanto cerebral como cerebelar. *Así, se detectó meningitis no supurativa en un 29% (4) de los animales. Un 14% (2) presentó encefalitis no supurativa y un 7% (1) encefalitis supurativas. En un 14% (2) de los casos, estas lesiones estuvieron acompañadas por vasculitis, y en un 7% (1) por edema y hemorragia perivascular y difusa (Tabla 14 y 15).*

Tabla 14: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes, observadas en los distintos sistemas u órganos estudiados. Porcentaje de animales afectados (número de animales). (*CGMN, células gigantes multinucleadas; CII, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos).*

SISTEMAS U ÓRGANOS AFECT.	% (N)	DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO MICROSCÓPICO	% (N)
Cutáneo	29% (4)	Dermatitis pustular	*14% (2)*
		Dermatitis ulcerativa	*7% (1)*
		Dermatitis eosinofílica	*21% (3)*
		Vasculitis necrotizante	*7% (1)*
		Furunculosis	*7% (1)*
Serosas	57% (8)	Pleuritis fibrinosa / fibrinopurulenta	*14% (2)*
		Pleuritis fibrosa	*29% (4)*
		Pericarditis fibrinosa / fibrinopurulenta	*14% (2)*
		Pericarditis fibrosa	*21% (3)*
		Perihepatitis fibrinopurulenta	*7% (1)*
		Serositis en estómago e intestino	*7% (1)*
		Peritonitis fibrinosa	*14% (2)*
Hígado	78% (11)	Hepatitis fibrosa (eosinofílica)	*29% (4)*
		Necrosis hepática centrolobulillar	*50% (7)*
		Hepatitis necrótica	*7% (1)*
		Hepatitis linfohistiocítica	*21% (3)*
		Hepatitis linfocítica periportal	*7% (1)*
Sist. digestivo	86% (12)	Gastritis linfoplasmocitaria	*14% (2)*
		Gastritis eosinofílica	*14% (2)*
		Gastritis fibrinosa	*7% (1)*
		Gastritis ulcerativa	*14% (2)*
		Enteritis linfoplasmocitaria/linfohistiocítica	*29% (4)*
		Enteritis eosinofílica	*21% (3)*
		Enteritis catarral	*14% (2)*
		Enteritis necrótica	*14% (2)*
		Enteritis fibrinonecrótica	*14% (2)*
Sist. urinario	64% (9)	Nefritis intersticial	*57% (8)*
		Nefritis intersticial crónica	*7% (1)*
		Glomerulonefritis fibrinonecrótica	*7% (1)*
		Tubulonefrosis	*7% (1)*
Sist. cardiovascular	36% (5)	Miocarditis supurativa subepicárdica	*7% (1)*
		Miocarditis no supurativa	*29% (4)*
		Endocardiosis	*7% (1)*

continuación:

Sist. respiratorio	***100% (14)***	***Bronconeumonía purulenta***	***21% (3)***
		Bronconeumonía fibrinopurulenta	***7% (1)***
		Bronconeumonía necroticohemorrágica	***7% (1)***
		Neumonía broncointersticial	***57% (8)***
		Neumonía intersticial	***57% (8)***
		Fibrosis y edema pulmonar	***7% (1)***
Órganos linfoides	100% (14%)	*Bazo*	
		Depleción linfoide	*50% (7)*
		Histiocitosis (CGMN/CII)	*29% (4)*
		Linfonodos	
		Depleción linfoide	*29% (4)*
		Histiocitosis (CGMN/CII)	*14% (2)*
		Hiperplasia linfoide	*50% (7)*
		Linfadenitis purulenta	*14% (2)*
		Linfadenitis fibrinonecrótica	*7% (1)*
		Timo	
		Histiocitosis (CGMN/CII)	*14% (2)*
		Tonsila	
		Depleción linfoide	*14% (2)*
		Histiocitosis	*7% (1)*
		Hiperplasia linfoide	*14% (2)*
		Tonsilitis purulenta	*14% (2)*
		Tonsilitis necrótica	*7% (1)*
		Tonsilitis fibrinonecrótica	*7% (1)*
		Placas de Peyer	
		Depleción linfoide	*21% (3)*
		Histiocitosis (CGMN/CII)	*14% (2)*
Sist. músculoesquelético	7% (1)	Artritis fibrinosa	*7% (1)*
SNC	36% (5)	Encefalitis supurativa	*7% (1)*
		Encefalitis no supurativa	*14% (2)*
		Meningitis no supurativa	*29% (4)*
		Vasculitis	*14% (2)*
		Hemorragia	*7% (1)*

Tabla 15: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes, observadas en en los distintos sistemas u órganos, en cada uno de los animales estudiados. (*CGMN, células gigantes multinucleadas; CII, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos).*

Diagnóstico morfológico histopatológico		Lechones											Ceb.	Reprod.	
		N4	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N16	N17	N22	N23	N5	N13	N14
Cutáneo	Dermatitis pustular												x	x	
	Dermatitis ulcerativa			x											
	Dermatitis eosinofílica												x	x	x
	Vasculitis necrotizante												x		
	Furunculosis														x
Serosa	Pleuritis fibrinosa/fib-pur.						x		x						
	Pleuritis fibrosa				x			x		x		x			
	Pericarditis fibrinosa/fib-pur.						x	x							
	Pericarditis fibrosa	x	x		x										
	Perihepatitis fibrinopurulenta	x					x								
	Serositis estómago e intestino				x										
	Peritonitis fibrinosa				x		x								
Hepático	Hepatitis fibrosa (eosinofílica)	x							x		x	x			
	Necrosis hepática centrolob.				x	x				x					
	Hepatitis necrótica			x											
	Hepatitis linfohistiocítica	x	x										x		
	Hepatitis linfocítica periportal													x	
Digestivo	Gastritis linfoplasmocitaria									x					
	Gastritis eosinofílica	x							x						
	Gastritis fibrinosa						x								
	Gastritis ulcerativa												x	x	
	Enteritis linfoplasm./linfohist.		x								x		x	x	
	Enteritis eosinofílica	x							x						x
	Enteritis catarral		x												x
	Enteritis necrótica				x					x					
	Enteritis fibrinonecrótica			x			x								
Renal	Nefritis intersticial		x		x	x	x		x	x	x		x		
	Nefritis intersticial crónica														x
	Glomerulonefritis fib-necrót.												x		
	Tubulonefrosis												x		
Cardiaco	Miocarditis supurativa subep.						x								
	Miocarditis no supurativa	x								x			x	x	
	Endocardiosis													x	
Pulmonar	***BN purulenta***						x	x						x	
	BN fibrinopurulenta			x											
	BN necroticohemorrágica				x										
	Neumonía broncointersticial	x	x		x	x			x		x	x	x		
	Neumonía intersticial	x		x				x	x	x	x	x	x		
	Fibrosis y edema pulmonar														x

continuación:

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO HISTOPATOLÓGICO		LECHONES										CEB.	REPROD.	
		N4	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N16	N17	N22	N23	N5	N13	N14
Órganos linfoides	*Bazo*														
	Depleción linfoide	x		x	x		x		x				x		x
	Histiocitosis (CGMN/CII)	x							x				x		
	Histiocitosis (megacariocitos)		x	x											
	Linfonodos														
	Depleción linfoide	x					x		x				x		
	Histiocitosis (CGMN/CII)								x				x		
	Hiperplasia linfoide				x	x		x		x	x	x			x
	Linfadenitis purulenta									x		x			
	Linfadenitis fibrinonecrótica			x											
	Timo														
	Histiocitosis (CGMN/CII)	x							x						
	Tonsila														
	Depleción linfoide	x							x						
	Histiocitosis								x						
	Hiperplasia linfoide													x	x
	Tonsilitis purulenta									x		x			
	Tonsilitis necrótica													x	
	Tonsilitis fibrinonecrótica			x											
	Placas de Peyer														
	Depleción linfoide	x							x				x		
	Histiocitosis (CGMN/CII)	x											x		
Articular	Artritis fibrinosa		x												
Nervioso	Encefalitis supurativa						x								
	Encefalitis no supurativa	x							x						
	Meningitis no supurativa	x			x				x				x		
	Vasculitis	x							x						
	Hemorragia								x						

4.1.3.1 LECHONES

N4: Lechón macho de 1,5-2 meses.

Diagn. morf. macroscópico: *Bronconeumonía supurativa leve a moderada y severa neumonía intersticial. Severo edema intersticial. Leve a moderada ascitis, hidrotórax e hidropericárdio. Pleuritis fibrinosa moderada. Peritonitis fibrinosa leve a moderada. Hepatitis fibrosa leve multifocal. Hemorragias multifocales moderadas en aurículas. Linfoadenomegalia generalizada de moderada a severa. Congestión severa generalizada y hemorragia focal de meninge en hemisferio derecho.*

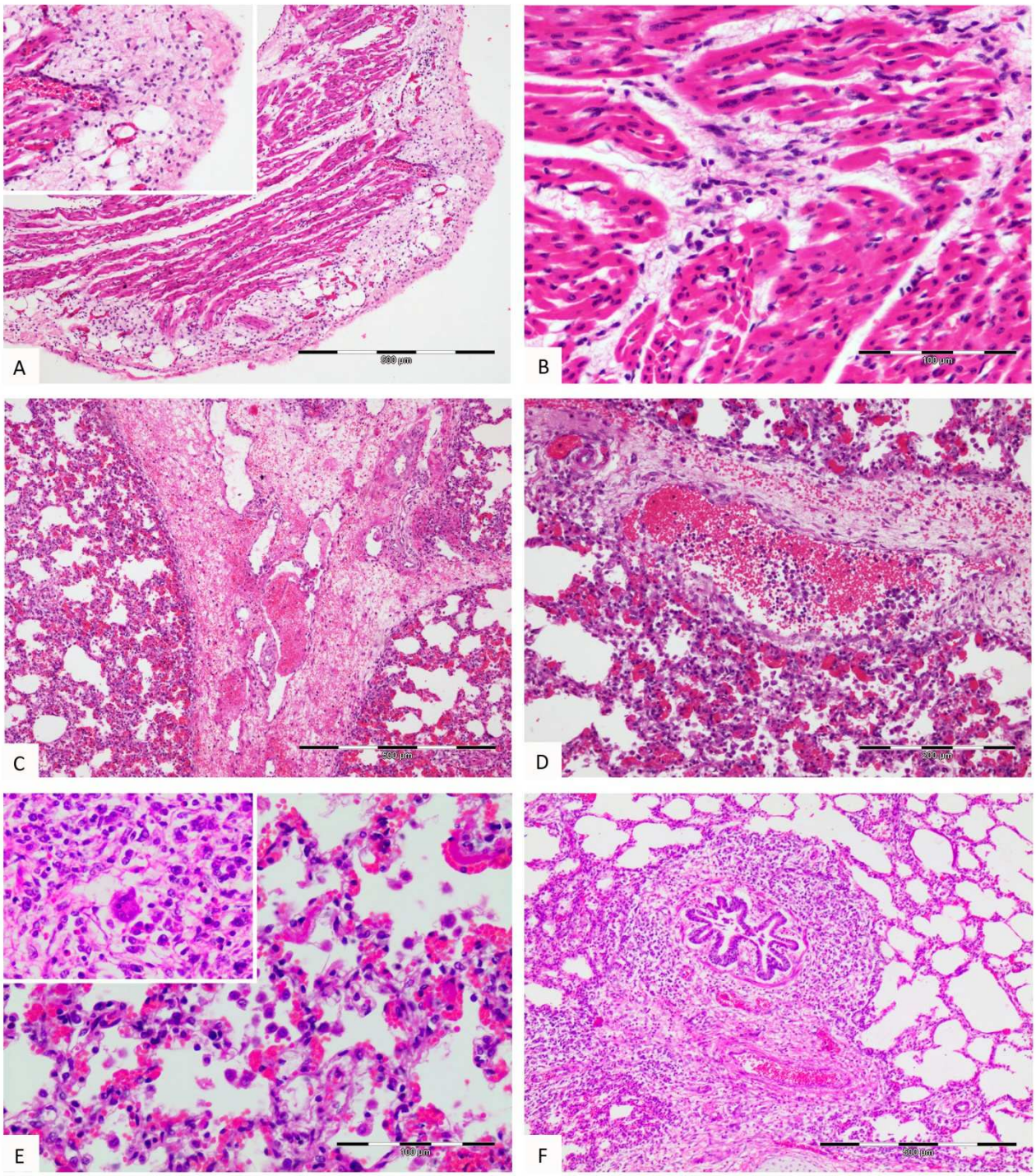


Figura 11: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en corazón y pulmón del ejemplar N4. A. Pericarditis fibrosa. Engrosamiento de epicardio con proliferación de tejido conectivo y escaso exudado de fibrina. Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario *(20x). Inset. Vasos sanguíneos con células endoteliales reactivas.* **B. Miocarditis no supurativa.** Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario multifocal perivascular en perimisio. *(40x).* **C-E. Neumonía intersticial severa. C.** Septos interlobulillares con abundante edema, fibrina e infiltrado inflamatorio mixto. **D.** Severa vasculitis con infiltrado inflamatorio mixto, degeneración hialina de paredes vasculares y trombosis. **E.** Paredes alveolares con hiperplasia de neumocitos tipo II y congestión en capilares. Exudado de fibrina, linfocitos, macrófagos activados y sincitios en luz alveolar *(40x). Inset. Detalle de sincitios*. **F. Neumonía broncointersticial leve.** Hiperplasia del BALT (grado I) (*F 10x*). ***(H&E).***

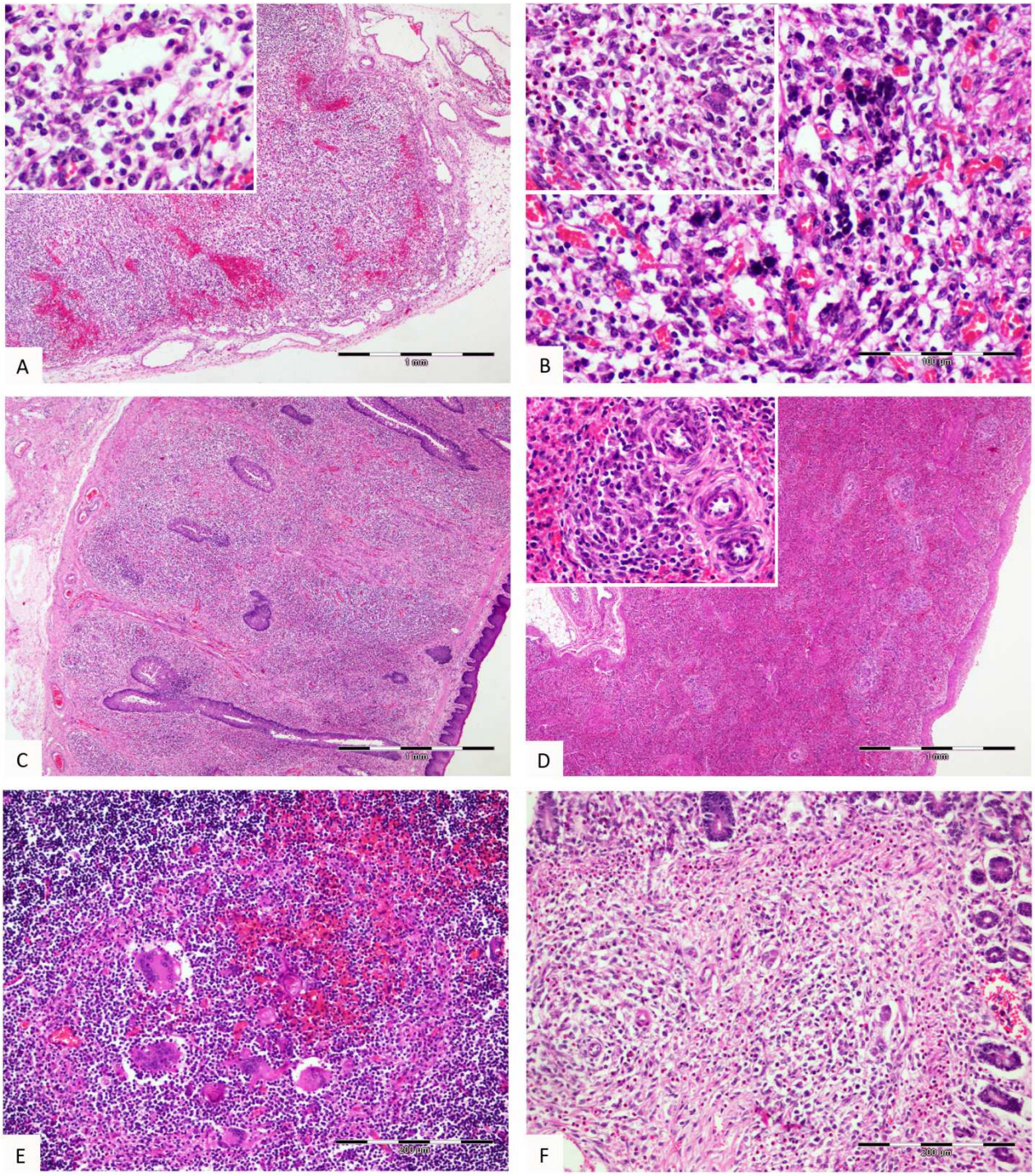


Figura 12: **Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en órganos y tejido linfoide del ejemplar N4. A. Severa depleción linfoide en LN inguinal superficial.** Pérdida de celularidad a nivel de folículos linfoides. Hemorragias multifocales *(4x)*. *Inset. Paredes vasculares con células endoteliales reactivas*. **B. Severa Linfocitolisis en folículos linfoides de LN inguinal superficial.** Células histiocíticas con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos. Infiltrado inflamatorio eosinófilos *(40x). Inset. Sincitios.* **C. Severa depleción linfoide en tonsila.** Escasa celularidad en folículos linfoides y zona parafolicular *(4x)*. **D. Moderada-severa depleción linfoide esplénica e histiocitosis.** Pérdida de celularidad en pulpa esplénica blanca a nivel de folículos linfoides y vainas linfoides periarteriolares *(4x). Inset*. *Infiltrado inflamatorio histiocítico*. **E. Histiocitosis en médula del timo**. Presencia de abundantes sincitios *(20x)*. **F. Depleción linfoide e histiocitosis en placa de Peyer.** Linfocitólisis e histiocitosis *(20x)*. ***(H&E).***

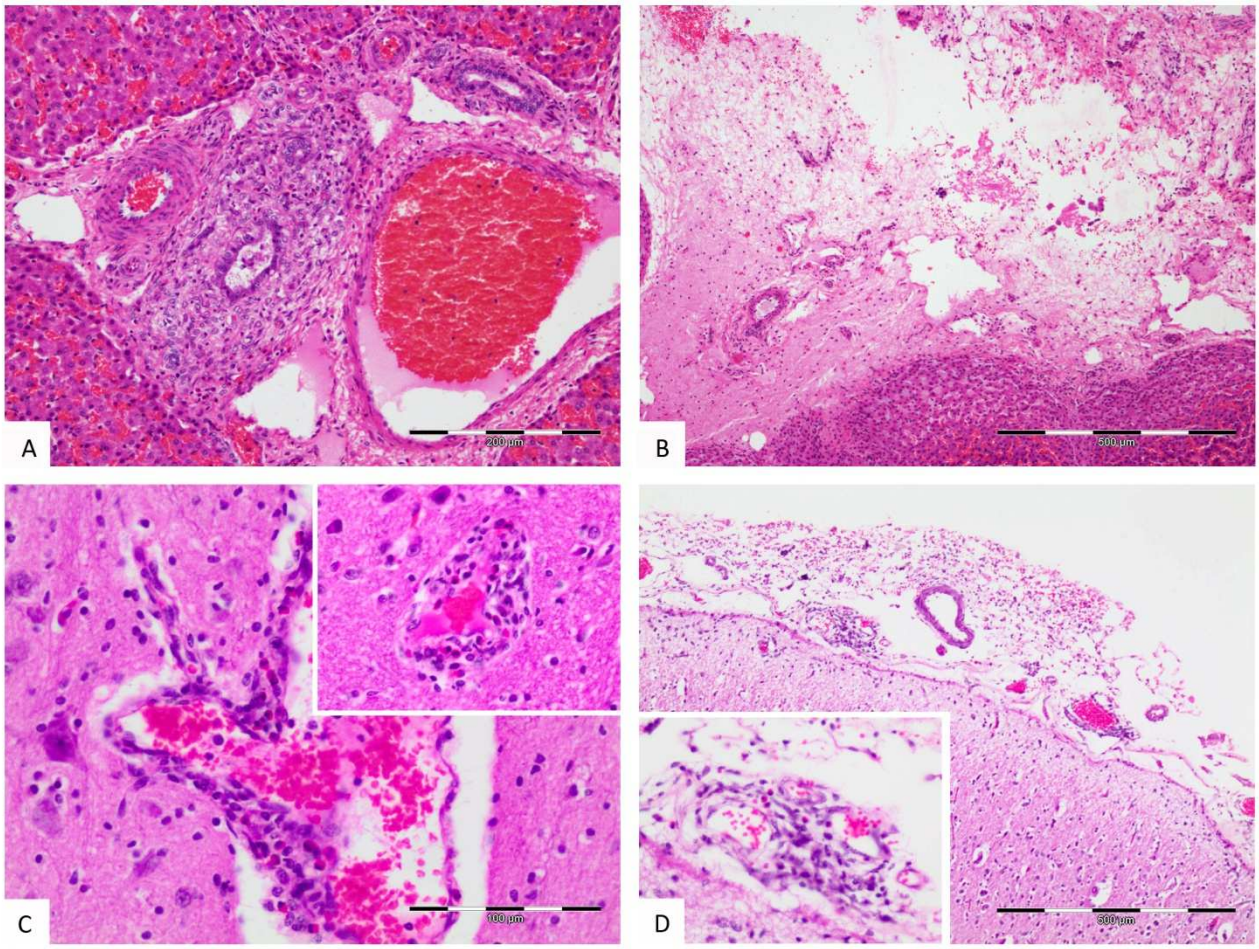


Figura 13: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en hígado y SNC del ejemplar N4. A. Hepatitis linfohistiocítica periportal multifocal. Infiltrado inflamatorio mixto con mononucleares linfohistiocíticos a nivel periportal multifocal *(20x).* **B Perihepatitis fibrinopurulenta severa.** Severa exudación de fibrina con neutrófilos y algunas células linfoplasmocitarias en la cápsula hepática extendiéndose al parénquima perivesical *(10x)*. **C. Encefalitis no supurativa con vasculitis moderada.** Infiltrado inflamatorio histiocítico con escasos neutrófilos en paredes vasculares *(40x). Inset. Infiltrado inflamatorio perivascular.* **D. Meningitis no supurativa moderada**. Moderado infiltrado inflamatorio linfohistiocítico en meninges, acompañadas de vasculitis y hemorragias *(10x)*. *Inset. Detalle*. ***(H&E).***

N7: Lechón macho de 1,5-2 meses.

Diagn. morf. macroscópico: *Bronconeumonía supurativa moderada. Peritonitis fibrinosa leve. Pericarditis fibrosa moderada. Enteritis catarral moderada a severa. Artritis fibrosa (cápsula articular de codo izquierdo y rodilla derecha).*

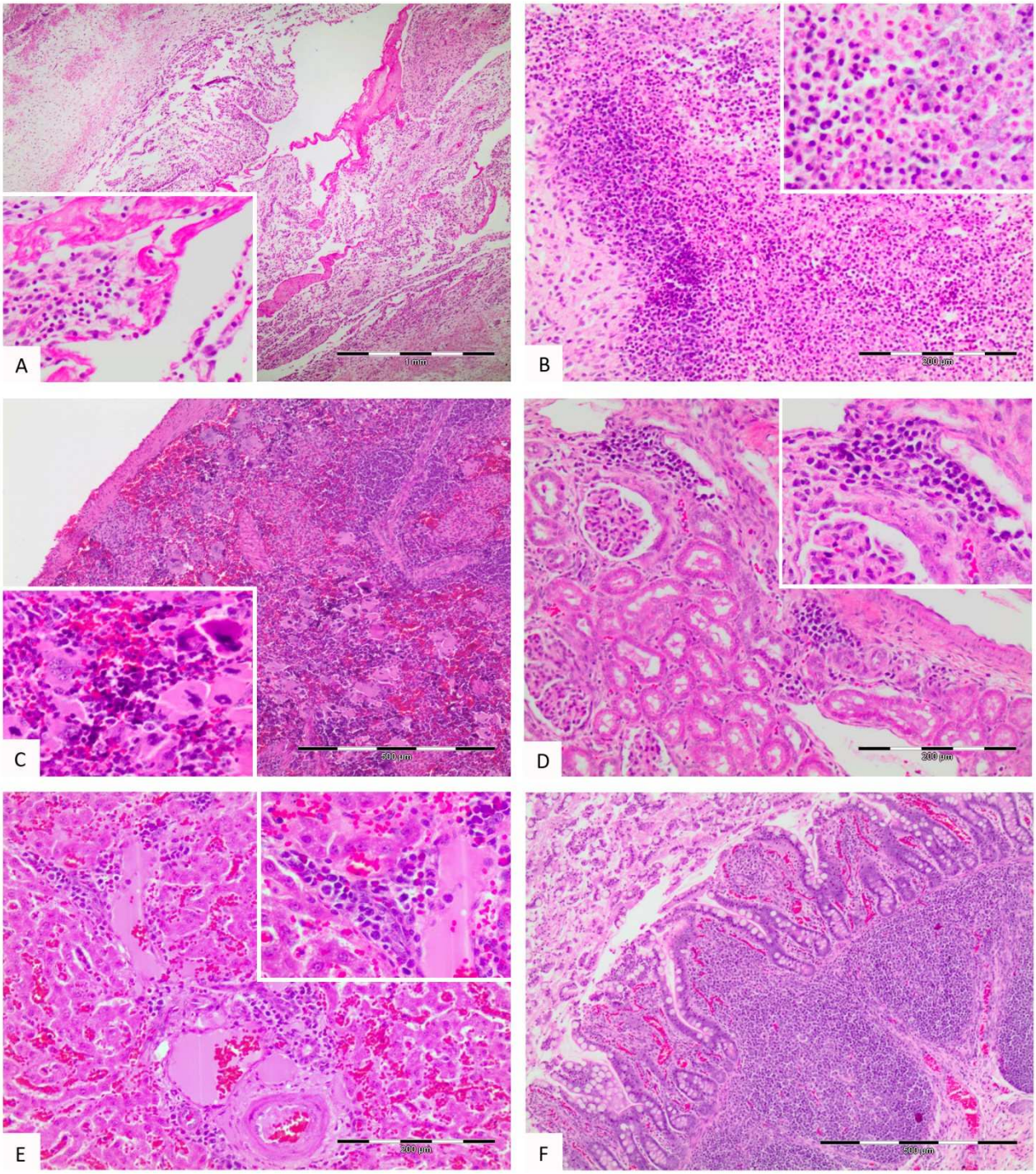


Figura 14: Diagnóstico morfológico de las lesiones más relevantes observadas articulaciones, bazo, riñón, hígado e intestino del ejemplar N7. A y B. Artritis fibrinosa subaguda-crónica. A. Hiperplasia de sinoviocitos de la membrana sinovial. Fibrina e infiltrado inflamatorio mixto con predominio de linfocitos y escasos neutrófilos *(4x). Inset. Detalle.* **B.** Infiltrado inflamatorio mixto, restos celulares, fibrina y bacterias en cápsula articular *(20x). Inset. Detalle*. **C. Histiocitosis esplénica.** Infiltrado inflamatorio histiocítico. Presencia de megacariocitos, congestión y hemorragia *(10x). Inset. Detalle de los megacoriocitos.* **D. Nefritis intersticial leve multifocal.** Infiltrado inflamatorio linfocítico multifocal a nivel intersticial *(20x). Inset. Detalle.* **E. Hepatitis linfohistiocítica multifocal.** Infiltrado inflamatorio linfohistiocítico y escasos eosinófilos multifocal periportal *(20x). Inset. Detalle.* **F. Enteritis catarral-linfoplasmocitaria (Íleon).** Hiperplasia de tejido linfoide asociado a la mucosa. Hiperplasia de células caliciformes en mucosa y abundante presencia de moco, células inflamatorias y epiteliales en luz intestinal. Congestión en mucosa y submucosa *(10x)*. ***(H&E).***

N8: Lechón hembra de 1,5 meses. Letargia, deshidratación, hipotermia, caquexia, vómito amarillo, exudado nasal mucopurulento, ictericia, pelo hirsuto, estertores respiratorios y muerte.

Diagn. morf. macroscópico: *Bronconeumonía supurativa focal leve. Necrosis hepática severa. Estasis de vesícula biliar. Tiflitis y colitis fibrinonecrótico multifocal trasmural severa. Linfoadenomegalia severa de LN mesentérico. Tonsilitis fibrinonecrótica focal bilateral.*

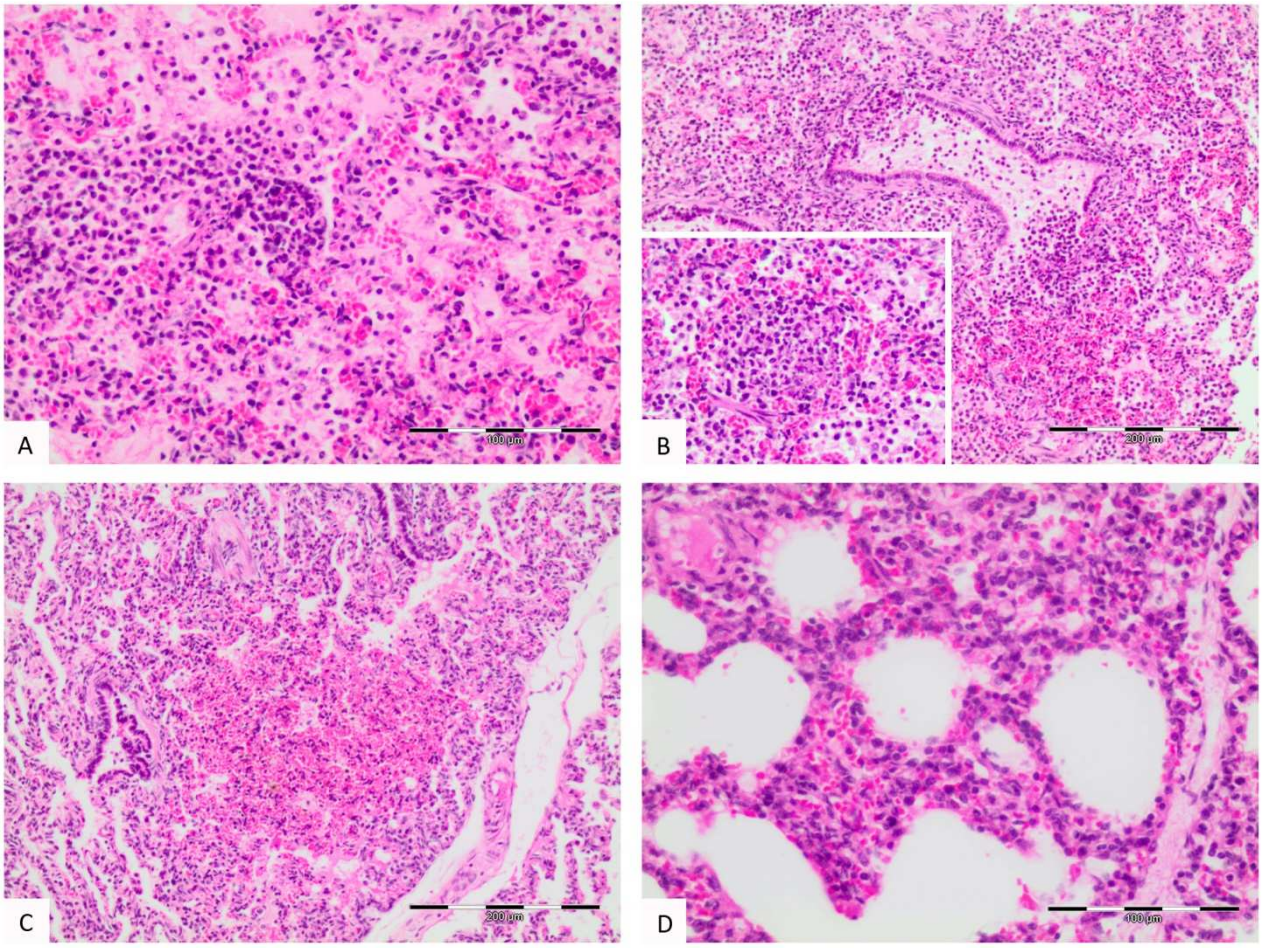


Figura 15: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en pulmón del ejemplar N8. A y B. Bronconeumonía fibrinopurulenta subaguda severa. A. Exudado inflamatorio neutrofílico y linfohistiocítico, con edema y fibrina en luz alveolar *(40x)*. **B.** Exudado inflamatorio y moco en luz bronquiolar. Infiltrado inflamatorio afectando al epitelio respiratorio, con necrosis de bronquiolos de pequeño calibre *(20x)*. *Inset. Bronquiolitis.* **C. Hemorragia multifocal** y **necrosis de paredes alveolares moderada** *(20x)*. **D. Neumonía Intersticial subaguda moderada.** Infiltrado inflamatorio linfocítico y netrofílico en paredes alveolares *(40x)*. ***(H&E).***

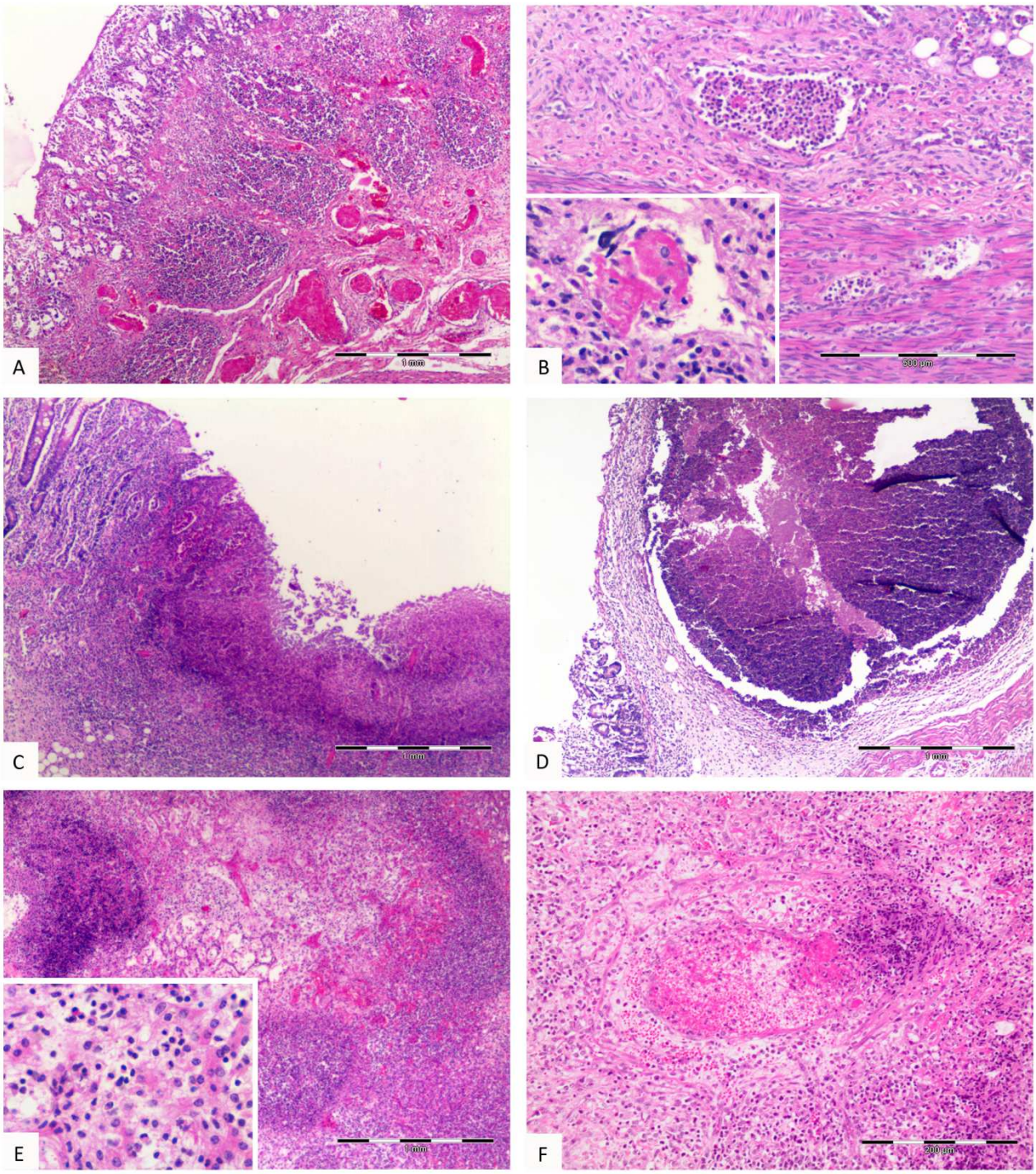


Figura 16: **Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en intestino e hígado del ejemplar N8. A-D. Intestino. A y B. Ileitis fibrinonecrótica,** Atrofia de vellosidades, infiltrado inflamatorio mixto en mucosa, severa congestión y trombosis en mucosa y submucosa *(4x)*. **B.** Infiltrado inflamatorio en submucosa y capa muscular *(10x)*. *Inset. Trombosis*. **C. Severa tiflitis fibrinonecrótica-ulcerativa.** Necrosis multifocal con infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear, fibrina y restos celulares, afectando a mucosa, submucosa y capa muscular *(4x)*. **D. Severa colitis necrótica.** Focos de necrosis con infiltrado inflamatorio polimorfonuclear y restos celulares, afectando mucosa y submucosa *(4x)*. **E-F. Severa hepatitis necrótica multifocal. E.** Necrosis de hepatocitos multifocal con infiltrado inflamatorio linfohistiocítico en los focos de necrosis con escasas células polimorfonucleares*(4x)*. *Inset. Nódulos paratíficos.* **F.** Trombosis, células endoteliales reactivas e infiltrado inflamatorio afectando la pared vascular *(vasculitis)*. Infiltrado inflamatorio mononuclear, hemorragia y fibrina en parénquima hepático *(20x)*. ***(H&E).***

N9: Lechón hembra de 1,5-2 meses.

Diagn. morf. macroscópico: *Bronconeumonía supurativa subaguda-crónica Bronconeumonía fibrinonecrótica focal aguda-subaguda. Pleuritis fibrosa multifocal moderada-severa. Pericarditis fibrosa moderada-severa. Peritonitis fibrinosa leve. Congestión hepática severa. Linfoadenomegalia generalizada moderada. Congestión en meninges.*

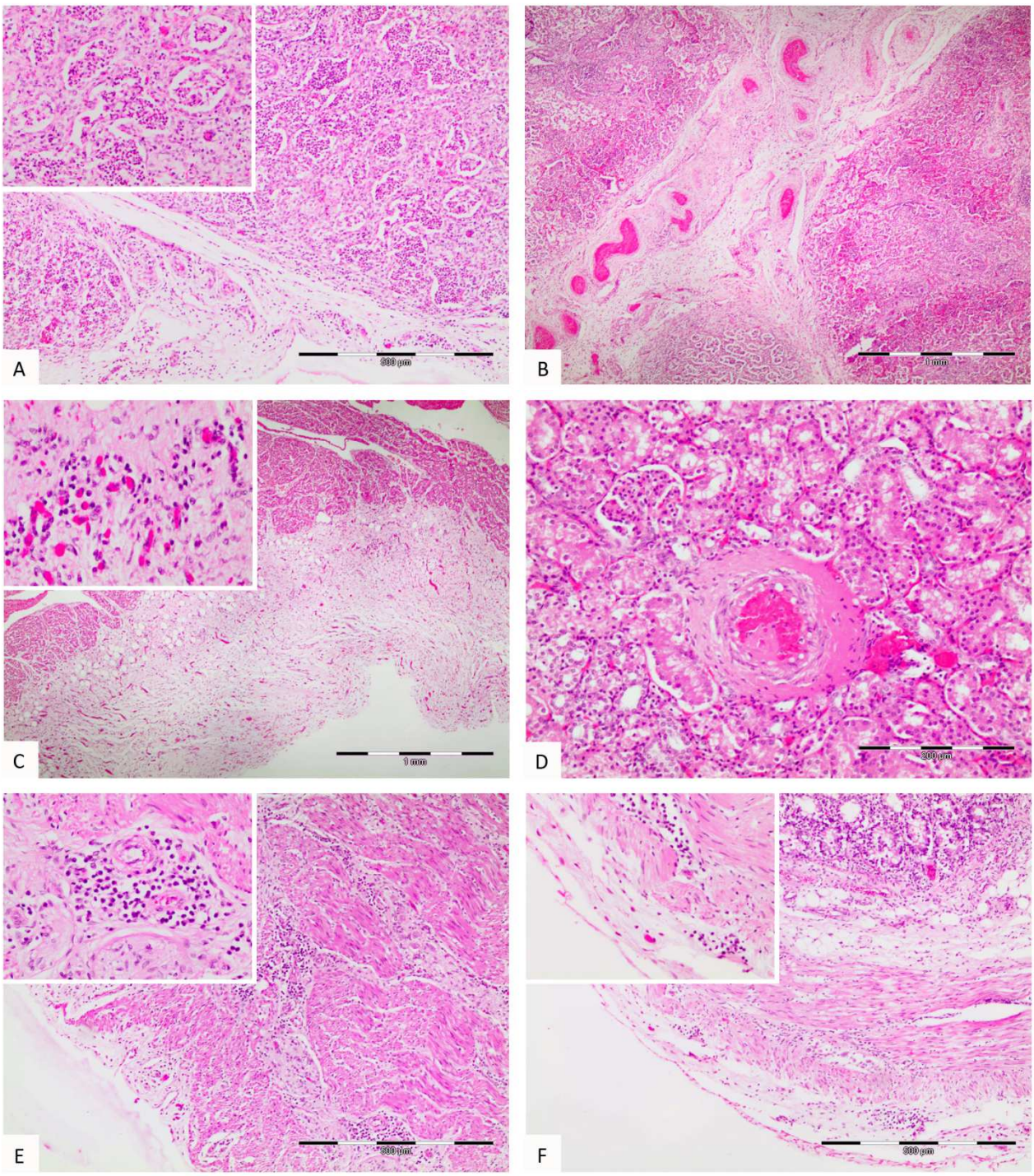


Figura 17: **Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en pulmón, corazón, riñón y aparato digestivo del ejemplar N9. A. Neumonía broncointersticial subaguda crónica severa y pleuritis fibrosa subaguda-crónica moderada.** Exudado inflamatorio neutrofílico en luz alveolar e hiperplasia de neumocitos tipo II. Proliferación de tejido conectivo e infiltrado inflamatorio neutrofílico en pleura. *(10x). Inset. Exudado neutrofílico e hiperplasia de neumocitos tipo II.* **B. Bronconeumonía necroticohemorrágica aguda.** Hemorragias multifocales, infiltrado inflamatorio neutrofílico y fibrina en luz alveolar. Severa proliferación de tejido conectivo en septos interlobulillares *(4x)*. **C. Pericarditis fibrosa severa.** Proliferación de tejido conectivo, neovascularización e infiltrado inflamatorio neutrofílico *(4x). Inset. Detalle del infiltrado inflamatorio.* **D. Hemorragia y trombosis renal.** Trombosis en vasos de mediano y pequeño calibre, con material hialino y hemorragia perivascular *(20x)*. **E y F. Serositis fibrinosa de estómago e intestino.** Moderado engrosamiento de serosa con infiltrado neutrofílico, escasas células linfoplasmocitarias y exudación de fibrina. En capa muscular, infiltrado inflamatorio neutrofílico y linfocítico perivascular *(C y D 10x)*. *Inset. Detalle del infiltrado.* ***(H&E).***

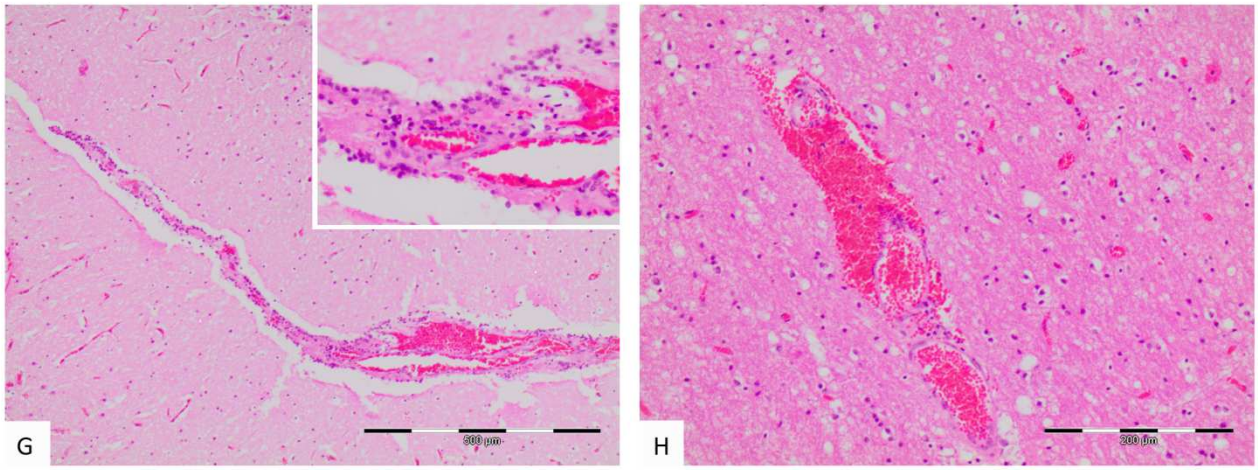


Figura 17 continuación: G. Meningitis no supurativa moderada. Infiltrado inflamatorio linfocítico en meninges *(4x)*. *Inset. Detalle del infiltrado.* **H. Hemorragia perivascular moderada** en encéfalo. ***(H&E).***

N10: Lechón hembra de 2,5 meses.

Diagn. morf. macroscópico: *Bronconeumonía supurativa crónica. Peritonitis fibrinosa. Congestión hepática moderada. Hepatitis fibrosa leve.*

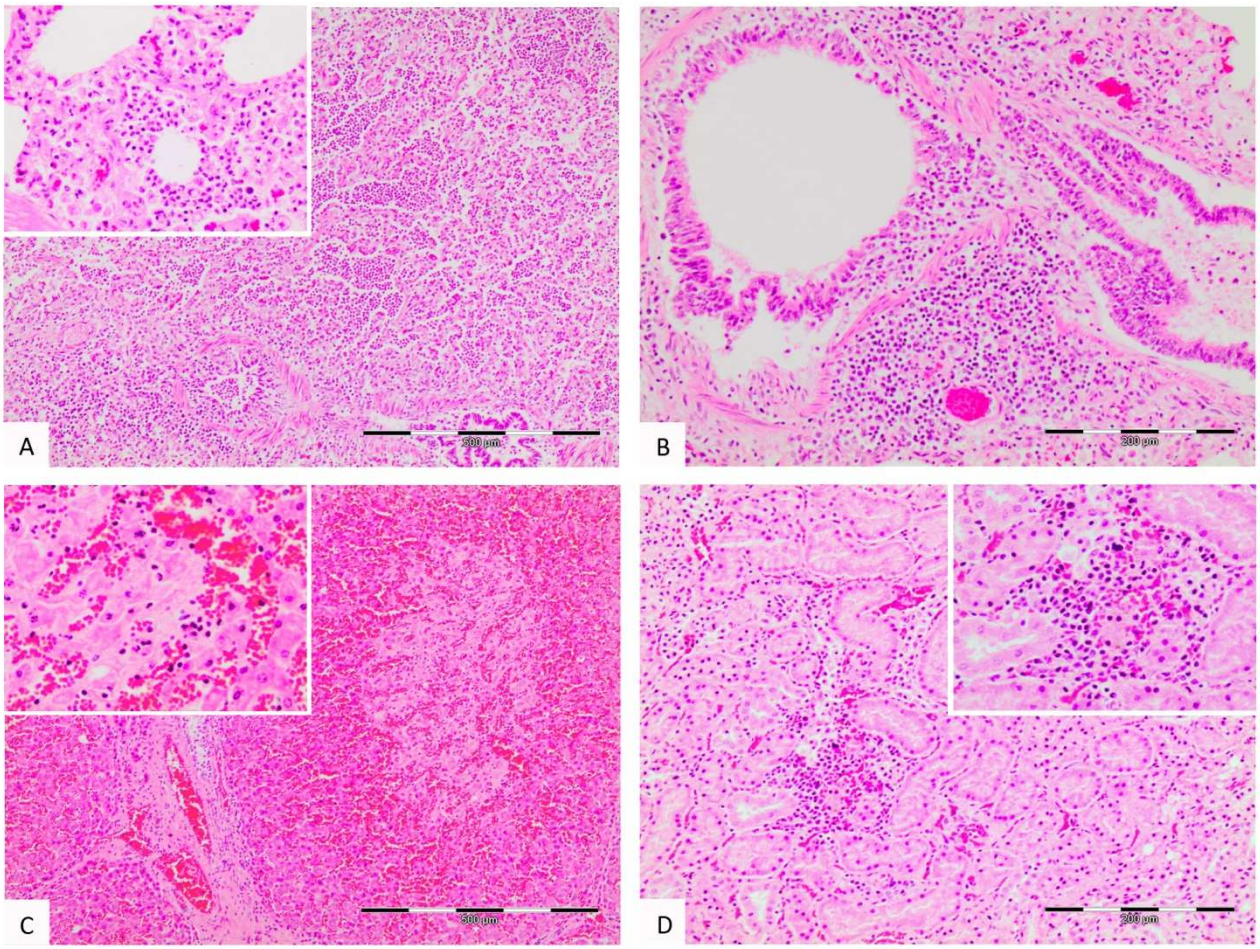


Figura 18: **Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en pulmón, hígado y riñón del ejemplar N10. A y B Neumonía broncointersticial.** Exudado inflamatorio neutrofílico en luz de vías aéreas y luz alveolar *(4x). Inset. Engrosamiento de paredes alveolares con proliferación de neumocitos tipo II, macrófagos alveolares y mononucleares.* **B.** Hiperplasia del BALT sin afectar a la capa muscular de la mucosa (Grado I) *(20x)*. **C. Necrosis hepática centrolobulillar moderada-severa.** Necrosis de hepatocitos, congestión severa de vena centrolobulillar y congestión en sinusoides hepáticos y espacios porta *(4x). (Inset).* **D. Nefritis intersticial multifocal moderada.** Infiltrado inflamatorio linfocítico multifocal a nivel intersticial *(20x). (Inset).* ***(H&E).***

N11: Lechón hembra de 2,5 meses.

Diagn. morf. macroscópico: *Bronconeumonía supurativa. Pleuritis, pericarditis y peritonitis fibrinosa moderada. Linfoadenomegalia moderada. Congestión en meninges.*

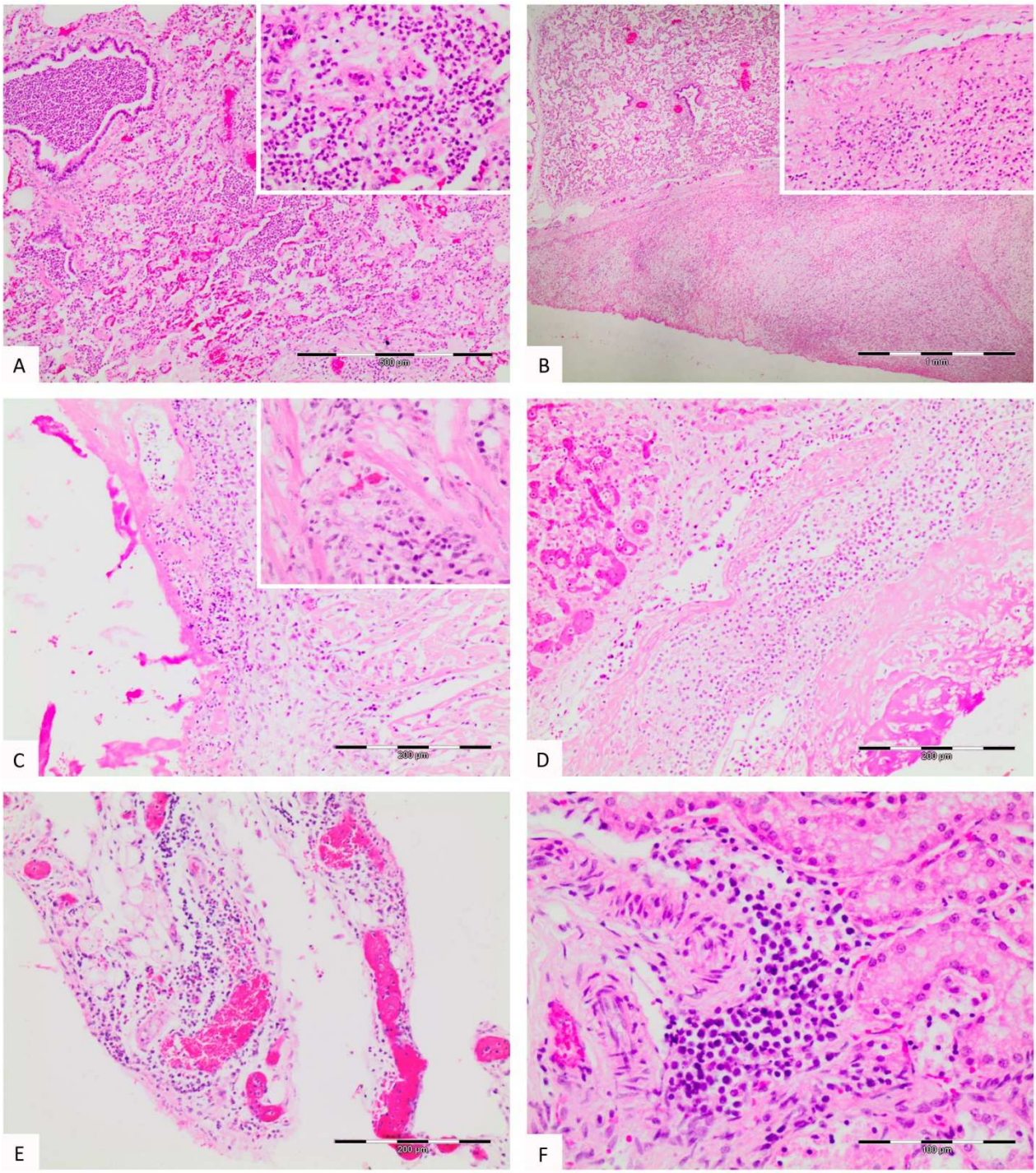


Figura 19: **Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en pulmón, corazón, hígado, serosas, y riñón del ejemplar N11. A. Bronconeumonía purulenta moderada-severa.** Exudado inflamatorio neutrofílico en vías aéreas y luz alveolar *(10x). Inset. Detalle del infiltrado inflamatorio en luz alveolar.* **B. Severa pleuritis fibrinosupurativa subaguda-crónica.** Infiltrado inflamatorio neutrofílico y fibrina con proliferación de tejido conectivo con neovascularización *(4x) Inset. Detalle del infiltrado inflamatorio.* **C. Severa pericarditis fibrinosupurativa subaguda-crónica.** Severo y difuso engrosamiento del pericardio por infiltrado neutrofílico y exudación de fibrina con proliferación de tejido conectivo. *Inset.* **Miocarditis subepicárdica purulenta.** Extensión del infiltrado inflamatorio neutrofílico y linfocítico en el miocardio subepicárdico *(20x)*. **D. Severa perihepatitis fibrinosupurativa.** Exudación de fibrina con polimorfonucleares neutrófilos sobre la cápsula de Glisson *(20x).* **E. Severa peritonitis fibrinosa.** Exudación de fibrina e infiltrado neutrofílico *(20x).* **F. Nefritis intersticial leve multifocal.** Infiltrado linfocítico en intersticio *(40x)*. ***(H&E).***

N12. Lechones hembras (N10 y N11) y macho (N12) de 2,5 meses.

Diagn. morf. macroscópico: *Bronconeumonía supurativa subaguda-crónica y neumonía intersticial. Pericarditis fibrinosa moderada. Peritonitis fibrinosa moderada-severa.*

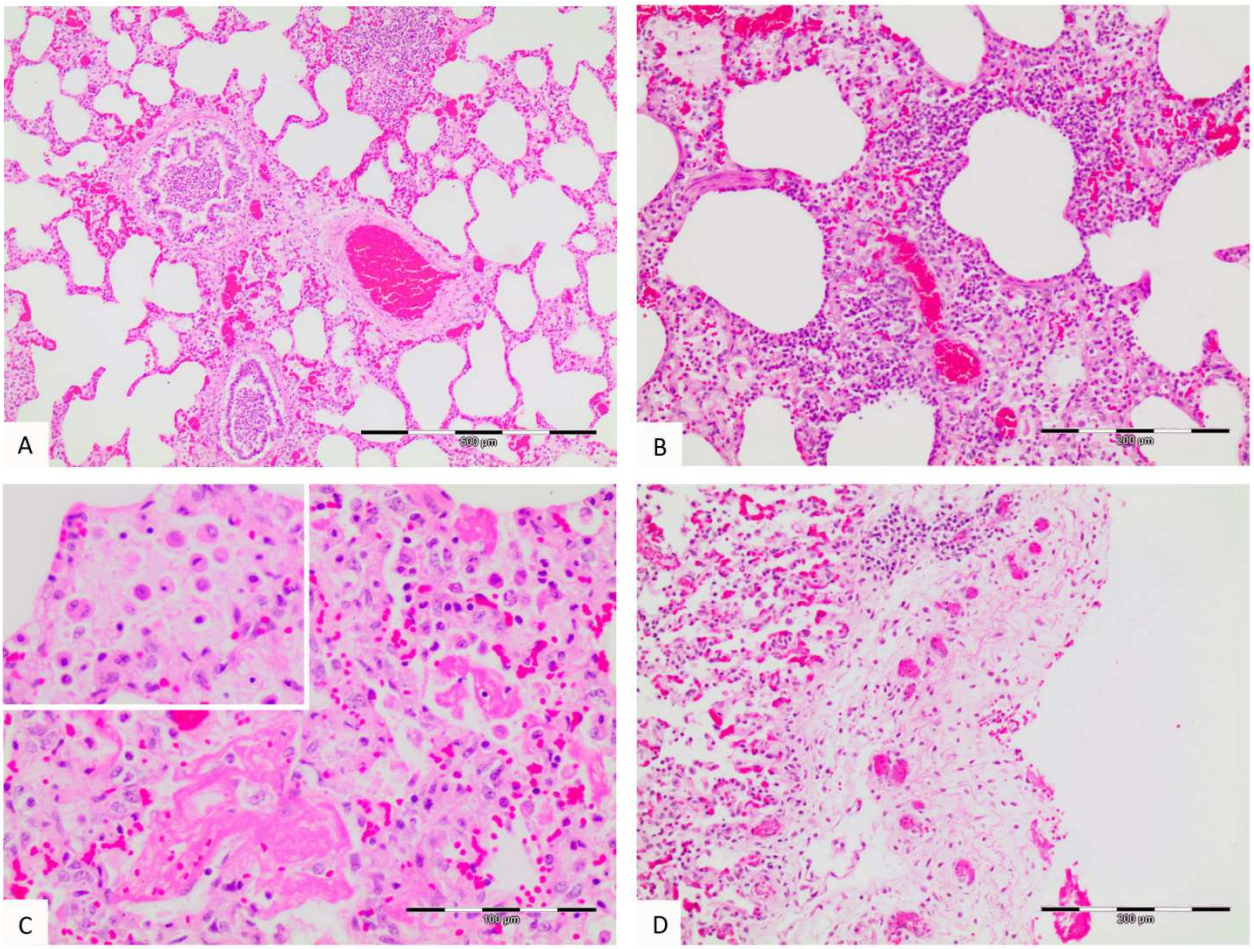


Figura 20: **Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en pulmón del ejemplar N12. A. Bronconeumonía purulenta leve.** Congestión generalizada y exudado inflamatorio polimorfonuclear en luz de vías aéreas, acompañado de infiltrado inflamatorio focal *(10x)*. **B y C. Neumonía intersticial moderada. B.** Infiltrado inflamatorio linfohistiocítico en paredes alveolares *(20x)*. **C.** Infiltrado inflamatorio linfohistiocítico, hiperplasia de neumocitos tipo II, con presencia de fibrina *(40x). Inset. Macrófagos alveolares espumosos y células binucleadas.* **D. Pleuritis fibrosa moderada-severa.** Proliferación de tejido conectivo con neovascularización e infiltrado inflamatorio perivascular en pleura *(20x).* ***(H&E).***

N16: Lechón macho de 1,5-2 meses. Camada de 8 lechones. Pérdida de apetito, retraso en el crecimiento y apatía. Tos y debilidad en las extremidades con incoordinación en los movimientos. Distrés respiratorio y muerte.

Diagn. morf. macrocópico: *Bronconeumonía supurativa lobular subaguda moderada. Neumonía intersticial difusa y edema intersticial moderado a severo. Pleuritis fibrinosa leve-moderada. Hidropericardio. Ascitis con peritonitis fibrinosa leve. Hepatitis fibrosa multifocal parasitaria severa. Linfoadenomegalia generalizada de moderada a severa. Congestión generalizada y hemorragia focal en meninge de hemisferio derecho. Hemorragias petequiales y equimosis severa en cerebelo. Hemorragias petequiales leve en sustancia blanca de cerebro.*

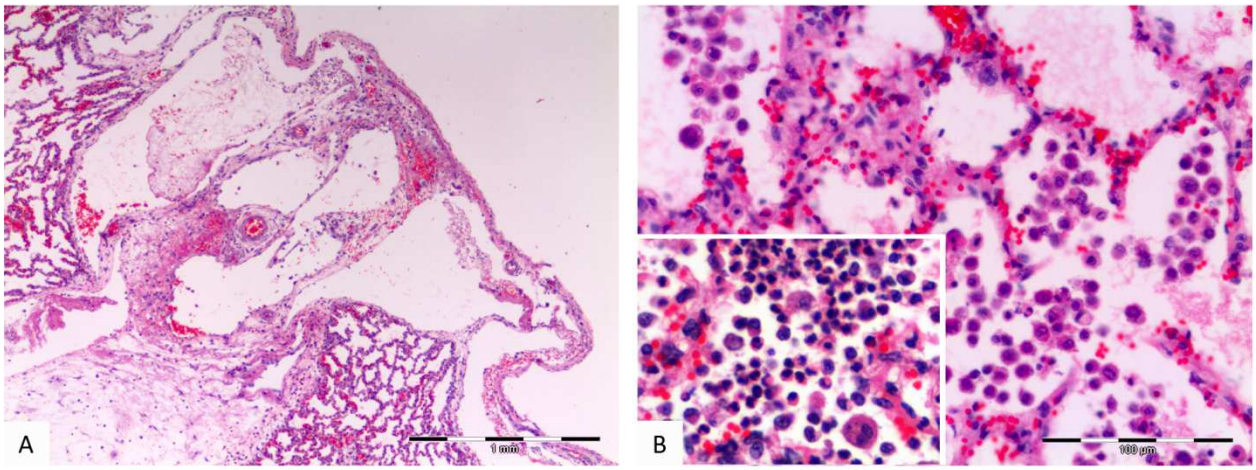


Figura 21: **Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en pulmón del ejemplar N16. A. Pleuritis fibrinosa moderada y edema intersticial severo.** Dilatación de vasos linfáticos, edema, hemorragias, fibrina e infiltrado de neutrófilos y mononucleares *(4x)*. **B. Neumonía Intersticial severa.** Infiltrado inflamatorio linfocítico en paredes alveolares. Exudado inflamatorio linfohistiocítico, con macrófagos alveolares espumosos y sincitios en luz alveolar y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos en macrófagos *(40x). Inset. Detalle del exudado en luz alveolar.* ***(H&E).***

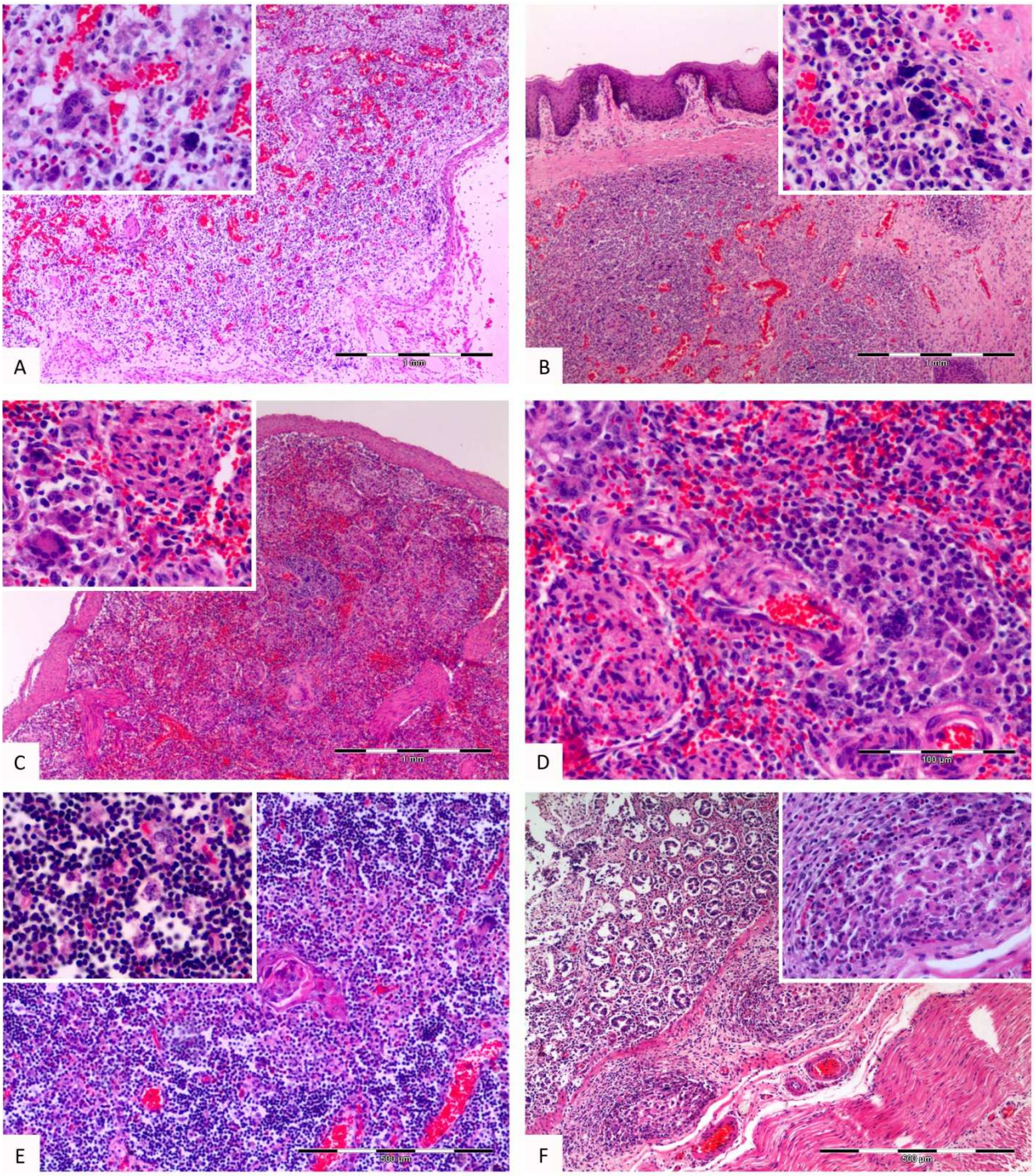


Figura 22: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en órganos y tejidos linfoides del ejemplar N16. A. Severa depleción linfoide e histiocitosis en LN inguinal superficial, acompañada de moderada a severa congestión. *(4x). Inset. Moderado infiltrado eosinofílico y severo infiltrado histiocítico, con presencia de sincitios y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos.* **B. Severa depleción linfoide e histiocitosis en tonsila**, acompañada de congestión *(4x)*. *Inset. Infiltrado inflamatorio eosinofílico e histiocítico con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos.* **C. Severa depleción linfoide e histiocitosis esplénica**, con ausencia de folículos linfoides, infiltrado histiocítico y hemorragias *(4x)*. *Inset. Detalle de los sincitios*. **D. Severa histiocitosis esplénica**. Infiltrado inflamatorio histiocítico en folículos linfoides y vainas linfoides perifolicular, con cuerpos de inclusión intracitoplasmático basófilos *(40x)*. **E. Histiocitosis de timo.** Infiltrado histiocítico con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos y sincitios y moderado infiltrado eosinofílico a nivel medular *(10x)*. *Inset. Detalle de sincitios e histiocitos con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos.* **F. Enteritis eosinofílica moderada y depleción linfoide severa de placas de Peyer.** Pérdida de celularidad a nivel de folículos linfoides acompañado de infiltrado inflamatorio histiocítico con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos *(10x)*. *Inset. Detalle de las placas de Peyer con infiltrado histiocítico y cuerpos de inclusión.* ***(H&E).***

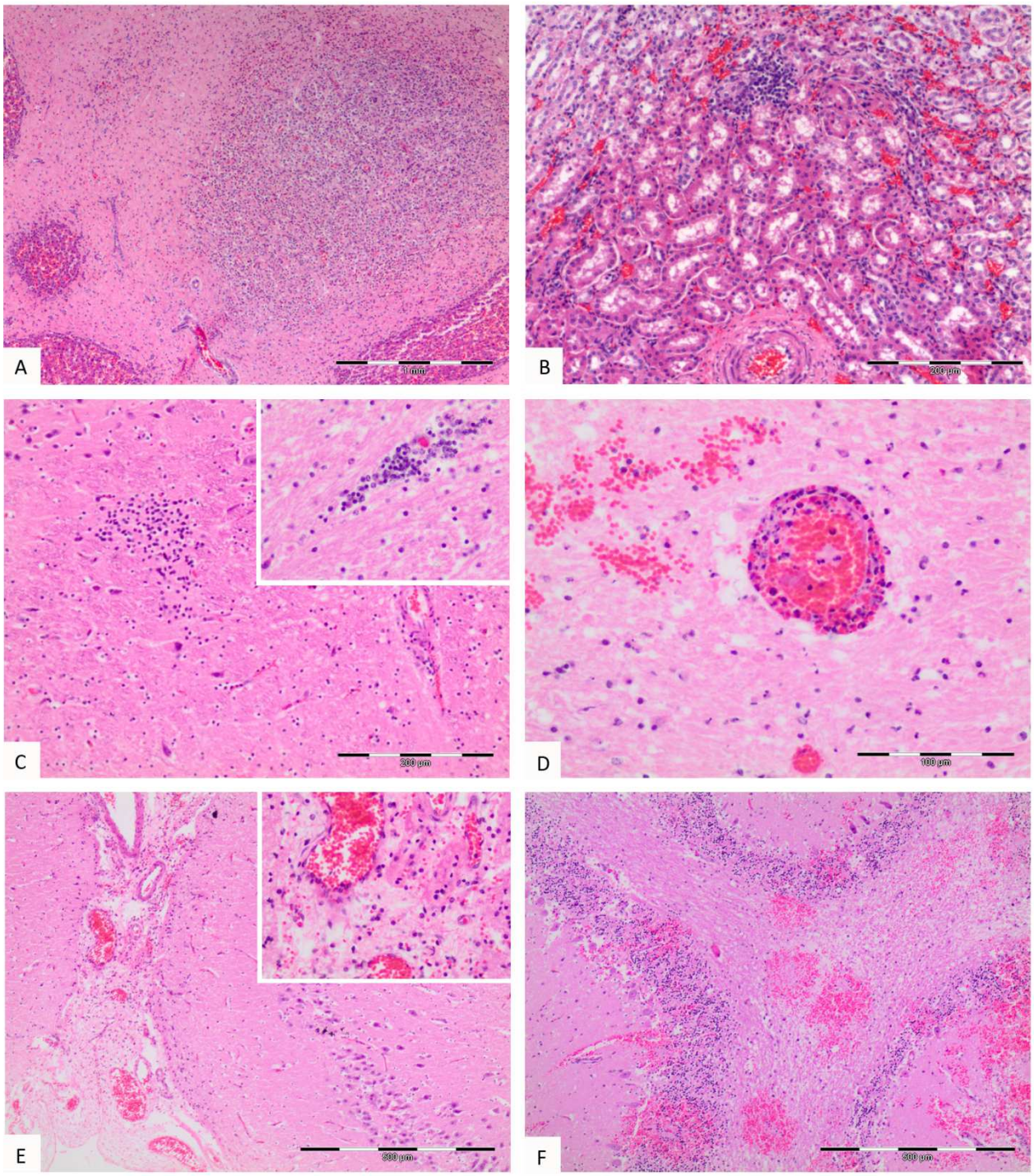


Figura 23: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en hígado, riñón y SNC del ejemplar N16. A. Severa hepatitis fibrosa eosinofílica. Infiltrado inflamatorio eosinofílico en septos interlobulillares con proliferación de tejido conectivo *(4x)*. **B. Nefritis intersticial leve-moderada multifocal.** Infiltrado inflamatorio linfocítico a nivel intersticial *(20x)*. **C. Encefalitis no supurativa. C.** Infiltrado linfocítico difuso en el parénquima nervioso *(20x) Inset. Linfocitos a nivel perivascular*. **D. Vasculitis en cerebro.** Infiltrado inflamatorio mixto linfocítico y neutrofílico en pared vascular. Hemorragias multifocales *(40x)*. **E. Meningitis no supurativa moderada.** Infiltrado linfocítico, hemorragia y edema *(10x). Inset. Detalle.* **F. Hemorragia** multifocal de distribución difusa en cerebelo *(10x)*. ***(H&E).***

N17: Lechón hembra de 1,5 meses que presentó muerte súbita.

Diagn. morf. macroscópico: *Neumonía intersticial leve. Edema subcutáneo. Hidrotórax leve-moderado. Hidropericardio leve-moderado. Ascitis y peritonitis fibrinosa leve. Congestión hepática severa. Linfoadenomegalia moderada-severa de LNs inguinal superficial, prefemoral, preescapular y mesentérico. Cardiomiopatía dilatada moderada-severa. Necrosis de miocardio multifocal. Congestión en meninges.*

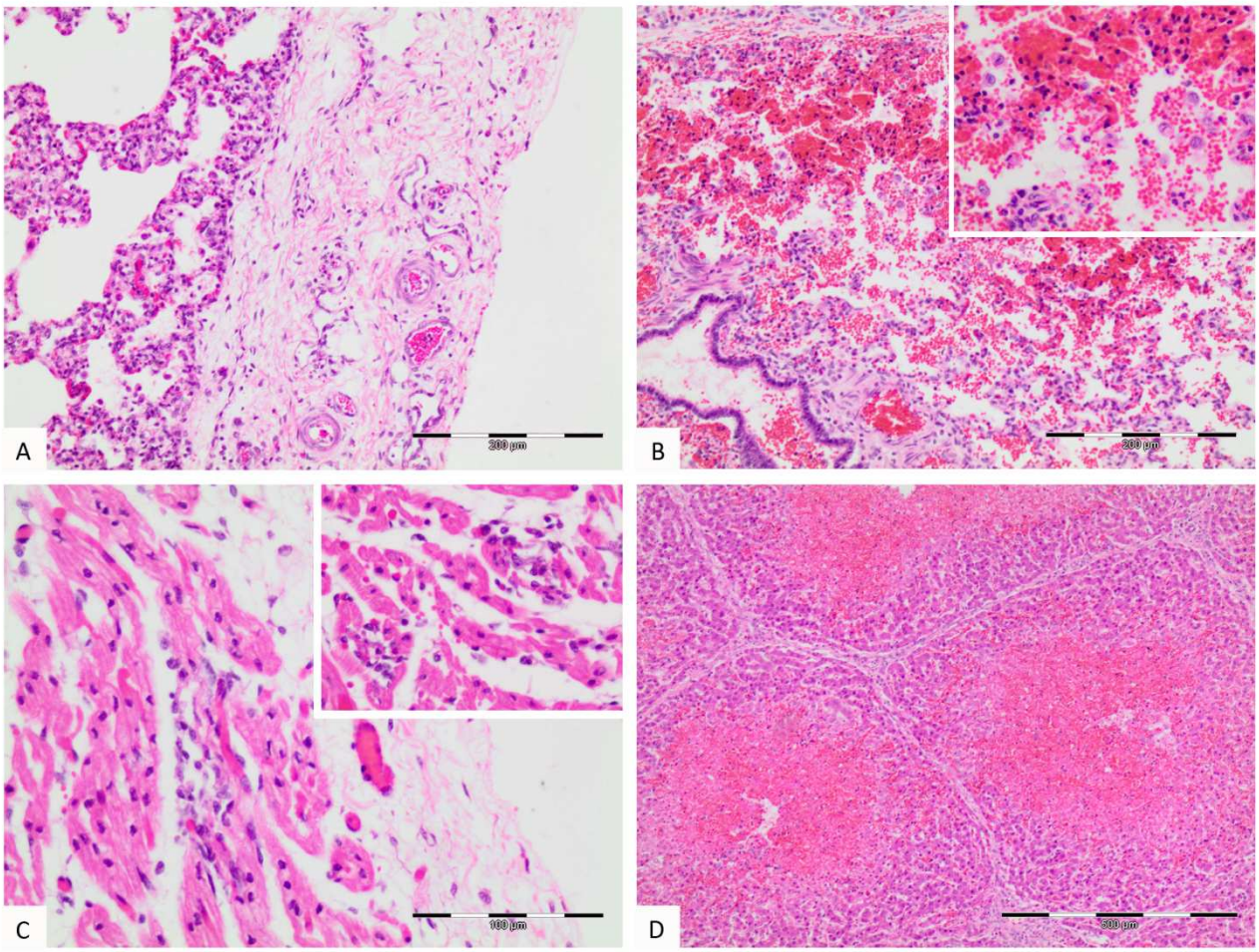


Figura 24: **Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en pulmón, corazón e hígado (continuación. *riñón y aparato digestivo*) del ejemplar N17. A. Pleuritis fibrosa moderada-severa y neumonía intersticial leve.** Proliferación de tejido conectivo, neovascularización e infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario en pleura. Engrosamiento de paredes alveolares con infiltrado linfocítico e hiperplasia de neumocitos tipo II *(20x).* **B.** Congestión pulmonar severa con hemorragia multifocal *(20x). Inset. Macrófagos alveolares y severa hemorragia en luz alveolar.* **C. Miocarditis no supurativa leve multifocal con necrosis de miocardiocitos.** Infiltrado inflamatorio linfohistiocítico multifocal, con necrosis de fibras musculares *(40x). Inset. Distribución multifocal.* **D. Severa necrosis hepática centrolobulillar.** Congestión severa de vena centrolobulillar con necrosis de hepatocitos circundantes y desorganización de cordones hepáticos *(10x).* ***(H&E).***

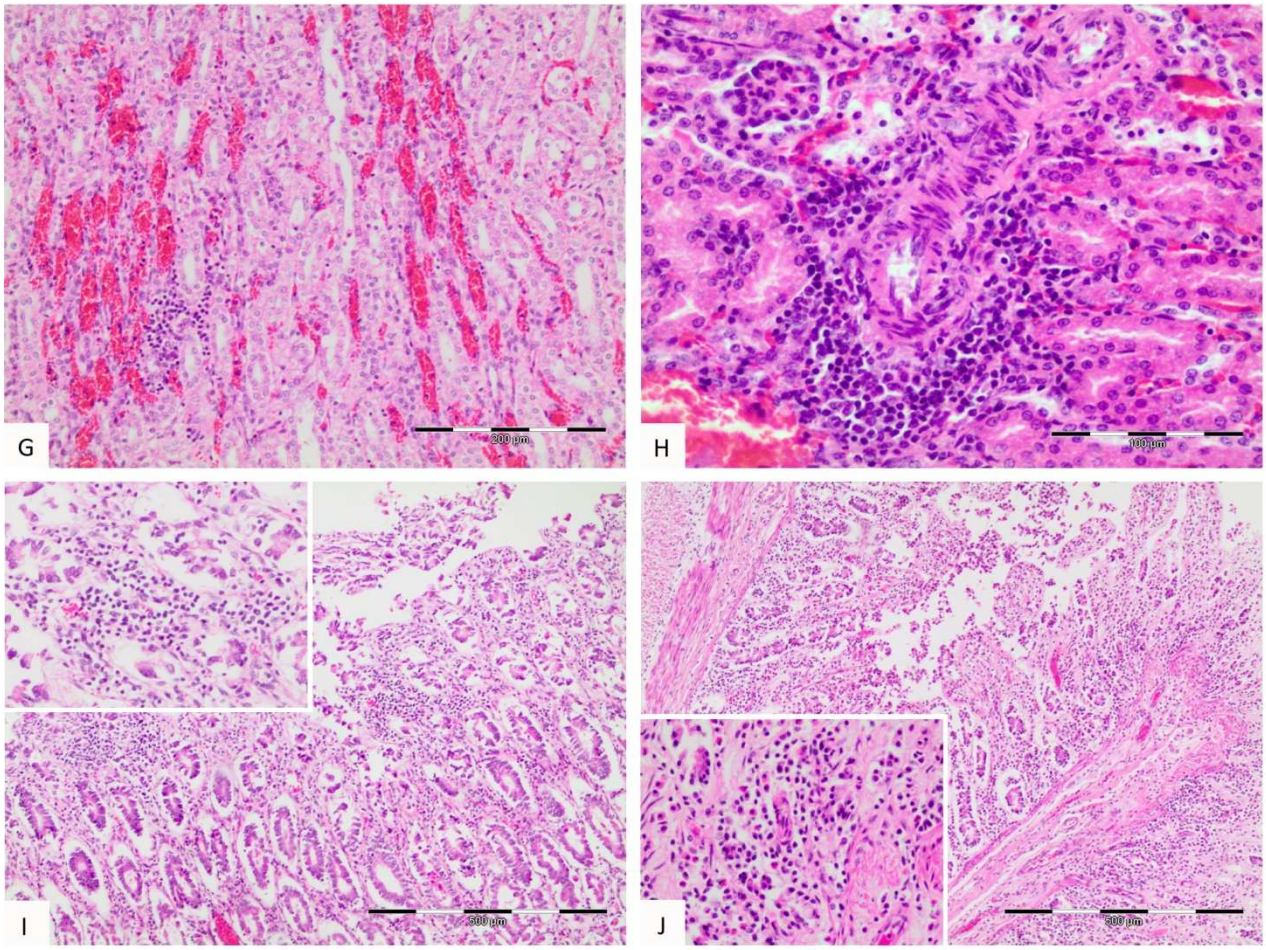


Figura 24. continuación: G y H. Nefritis intersticial leve-moderada multifocal. Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario multifocal intersticial *y* perivascular. Congestión *(G, 20x; H, 40x)*. **I. Gastritis linfoplasmocitaria moderada.** Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario multifocal en mucosa gástrica *(10x)*. **J. Enteritis necrótica moderada (Yeyuno).** Acortamiento, fusión y necrosis de vellosidades con moderado a severo infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario y escasos eosinófilos. Descamación del epitelio y células inflamatorias en luz intestinal *(10x). Inset. Detalle del infiltrado inflamatorio.* ***(H&E).***

N22 y N23. Lechones machos de 2,5-3,5 meses procedentes de un explotación de cerdo híbrido (ciclo cerrado 150 reproductoras) con ejemplares CNC. Lechones híbridos y de CNC con sintomatología nerviosa, pedaleo, y rigidez en cuello. Muerte a los 2-3 días. Animales vacunados de Circovirus, PRRSv controlado e indemne de Aujeszky. *Explotación no incluida en Estudio serológico (Estudio 3).*

N22. Diagn. morf. macroscópico: *Neumonía intersticial aguda moderada. Peritonitis fibrinosa leve-moderada. Leve edema subcutáneo y parpebral. Linfoadenomegalia moderada-severa generalizada. Hemorragia petequial en surcointerventricular. Congestión en meninges*

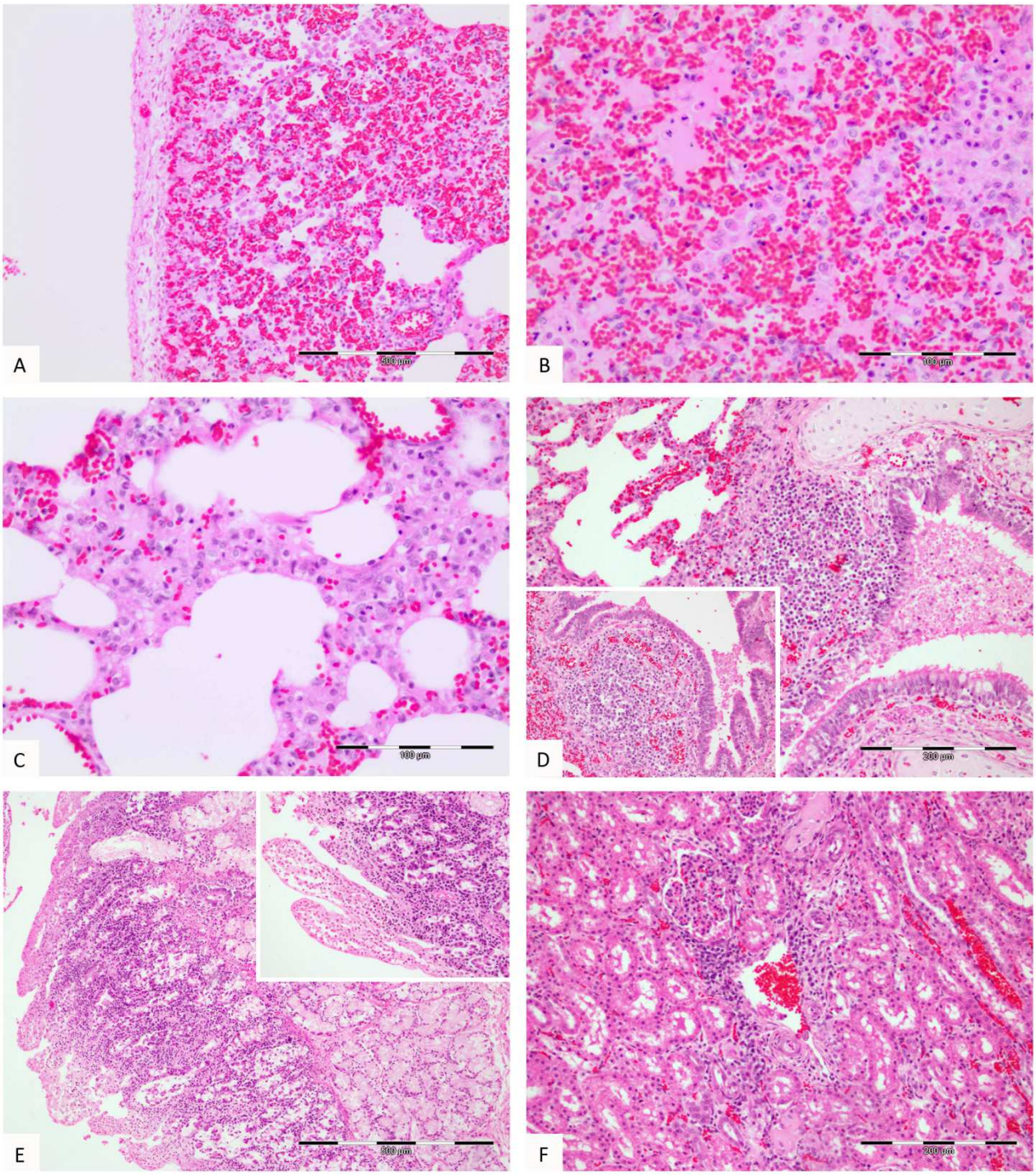


Figura 25: **Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en pulmón, intestino y riñón en el ejemplar N22. A-D. Neumonía intersticial modera y leve neumonía broncointersticial. A.** Severa congestión generalizada y edema multifocal en luz alveolar *(10x)*. **B.** Exudado inflamatorio linfocítico y macrófagos alveolares activados en luz alveolar e hiperplasia de neumocitos tipo II *(40x)*. **C.** Infiltrado linfocítico/linfoplasmocitario en paredes alveolares *(40x)*. **D.** Hiperplasia del BALT afectando a capa muscular (G II) *(20x)*. **E. Enteritis linfoplasmocitaria.** Moderado infiltrado difuso de células linfoplasmocitarias en la lámina propia del duodeno *(10x). Inset. Detalle del infiltrado inflamatorio.* **F. Leve nefritis intersticial.** Infiltrado inflamatorio linfocítico a nivel intersticial *(20x)*. ***(H&E).***

N23. Diagn. morf. macroscópico: *Bronconeumonía supurativa lobular aguda-subaguda moderada. Hidrotórax e hidropericardio leve. Peritonitis fibrinosa leve-moderada. Linfoadenomegalia moderada-severa generalizada. Tonsilitis supurativa.*

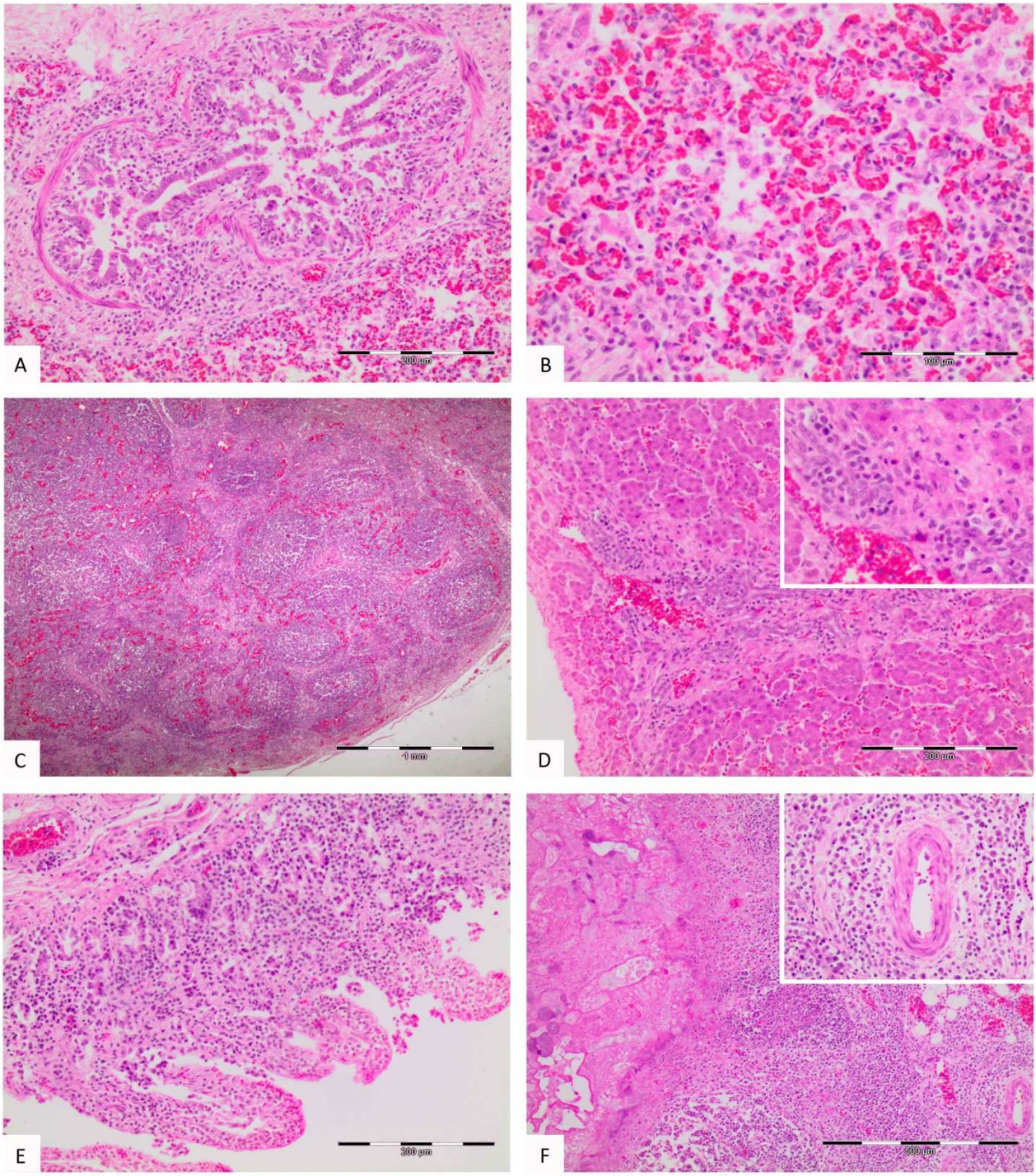


Figura 26: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en pulmón, linfonodos, hígado e intestino delgado en el ejemplar N23. A y B. Neumonía broncointersticial y neumonía intersticial moderada. A. Infiltrado inflamatorio linfocítico peribronquial *(20x)*. **B.** Congestión de capilares alveolares. Edema y exudado inflamatorio linfocítico/macrofágico, macrófagos alveolares activados e hiperplasia de neumocitos tipo II *(40x).* **C. Hiperplasia linfoide reactiva** en LN mesentérico *(4x)*. **D. Hepatitis fibrosa eosinofílica moderada.** Proliferación de tejido conectivo en espacios porta con infiltrado inflamatorio eosinofílico y linfocítico *(Inset) (20x)*. **E y F. Enteritis necrótica linfoplasmocitaria moderada.** Infiltrado inflamatorio linfocítico en mucosa del yeyuno y necrosis de vellosidades intestinales *(20x).* **F.** Necrosis de mucosa del íleon con gran cantidad de bacterias *(10x). Inset. Infiltrado inflamatorio linfocítico en submucosa a nivel perivascular.* ***(H&E).***

4.1.3.2 ANIMALES DE CEBO

N5: Animal de cebo de 7 meses. Presentó debilidad en extremidades posteriores, convulsiones y vómitos en las últimas 24hs.

Diagn. morf. macroscópico: *Bronconeumonía supurativa leve-moderada. Neumonía intersticial moderada. Úlceras gástricas en pars glandular. Leve edema subcutáneo. Máculas y pápulas en extremidades posteriores, abdomen y tórax. Nefritis intersticial multifocal diseminada. Linfoadenomegalia moderada-severa generalizada.*

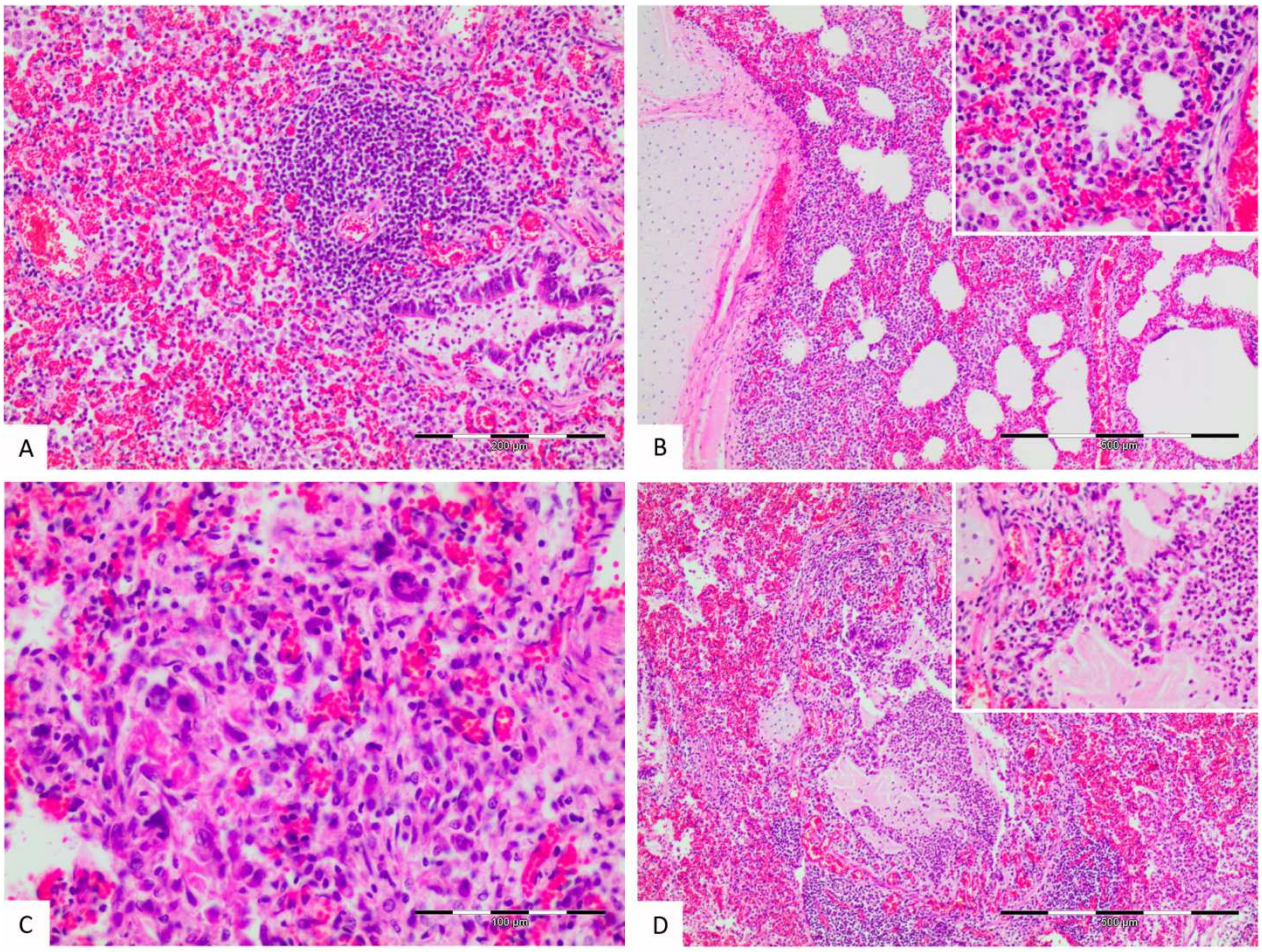


Figura 27: **Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en pulmón del ejemplar N5. A. Neumonía broncointersticial moderada-severa.** Congestión e hiperemia en vasos de mediano y pequeño calibre, acompañado de infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario perivascular. Exudado inflamatorio linfocítico/macrofágico y neutrofílico en luz alveolar *(20x)*. **B y C. Neumonía intersticial severa. B.** Infiltrado inflamatorio linfohistiocítico e hiperplasia de neumocitos tipo II *(10x). Inset. Macrófagos alveolares activados. Congestión de capilares alveolares*. **C.** Infiltrado inflamatorio linfohistiocítico y sincitios*(40x)*. **D. Bronquitis aguda severa asociada a neumonía intersticial.** Congestión severa de capilares alveolares. Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario en lámina propia de pared bronquial, necrosis y pérdida de epitelio respiratorio *(10x)*. *Inset. Severo exudado inflamatorio linfohistiocítico y neutrofílicos, moco y descamación del epitelio en vías aéreas.* ***(H&E).***

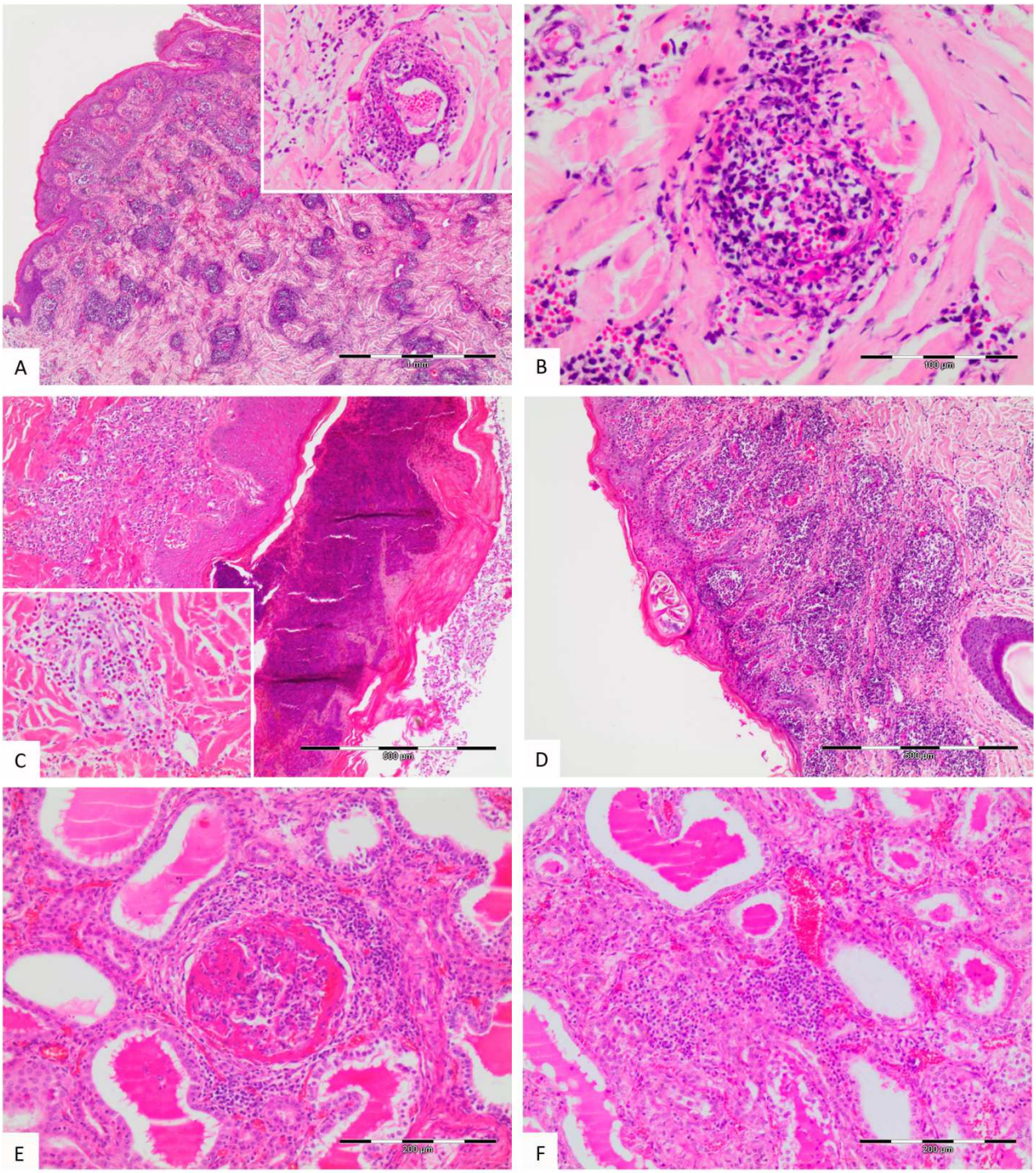


Figura 28: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en piel y riñón del ejemplar N5. A-D Piel. A y B. Severa vasculitis necrotizante multifocal en dermis. A. Severo infiltrado inflamatorio en paredes de capilares y arteriolas de dermis superficial y profunda *(4x). Inset. Necrosis fibrinoide de la íntima con severo infiltrado mixto en la pared vascular.* **B.** Necrosis fibrinoide de la pared vascular en dermis *(40x).* **C y D. Dermatitis pustular subcorneal y dermatitis eosinofílica perivascular. C.** Severo infiltrado inflamatorio, material necrótico y restos celulares en epidermis (10x). *Inset. Infiltrado inflamatorio polimorfonuclear eosinofílico perivascular en dermis superficial (10x).* **D.** Presencia de estructuras parasitarias (*Sarcoptes scabiei*) en estrato córneo de epidermis. Hemorragias multifocales en dermis superficial e infiltrado inflamatorio *(10x).* **E y F Riñón. E. Glomerulonefritis fibrinonecrotizante.** Espacio glomerular conteniendo abundante fibrina e infiltrado inflamatorio linfocítico *(20x).* **F. Nefritis intersticial** con infiltrado linfoplasmocitario multifocal y dilatación de túbulos renales con presencia de material proteináceo en la luz y glóbulos hialinos intracitoplasmáticos en epitelio tubular *(20x).* ***(H&E).***

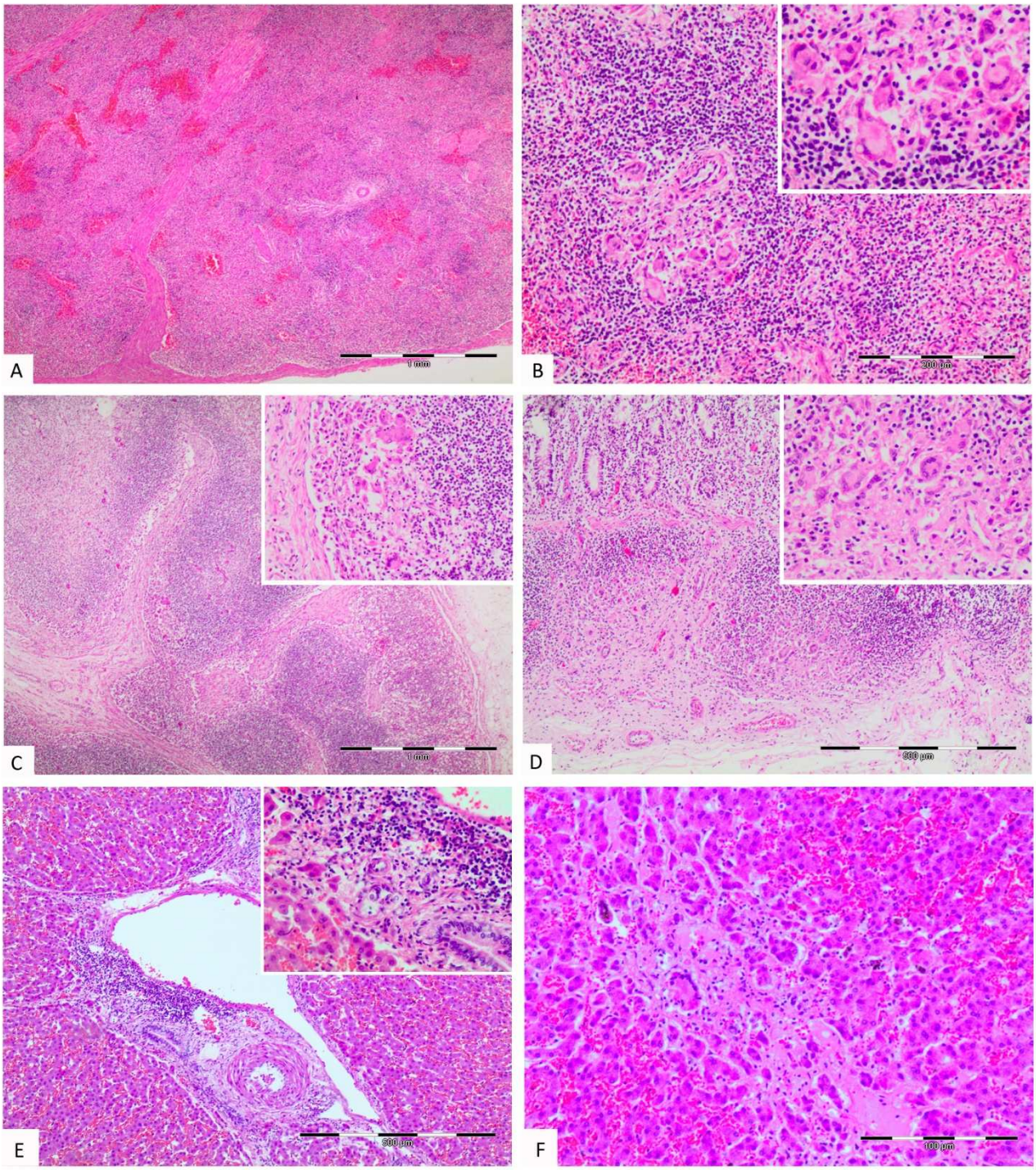


Figura 29: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en órganos linfoides e hígado del ejemplar N5. A y B. Bazo. A. Severa depleción linfoide de pulpa esplénica blanca *(4x)*. **B. Severa histiocitosis** en pulpa esplénica roja *(20x). Inset. Presencia de sincitios a nivel centrofolicular.* **C. Severa depleción linfoide** de LN inguinal superficial *(4x). Inset. Histiocitosis y presencia de sincitios en senos medulares.* **D. Enteritis linfohistiocítica moderada.** Infiltrado inflamatorio linfohistiocítico y escasos eosinófilos en mucosa y submucosa *(10x). Inset. Depleción linfoide en placas de Peyer con severa histiocitosis y sincitios*. **E y F. Hepatitis linfohistiocítica. E.** Infiltrado inflamatorio linfohistiocítico y escasos eosinófilos en espacio porta *(10x). Inset. Detalle del infiltrado inflamatorio en espacio porta.* **F.** Desorganización de cordones hepáticos con necrosis de hepatocitos y presencia de sincitios. Congestión y edema en sinusoides hepáticos *(20x)*. ***(H&E).***

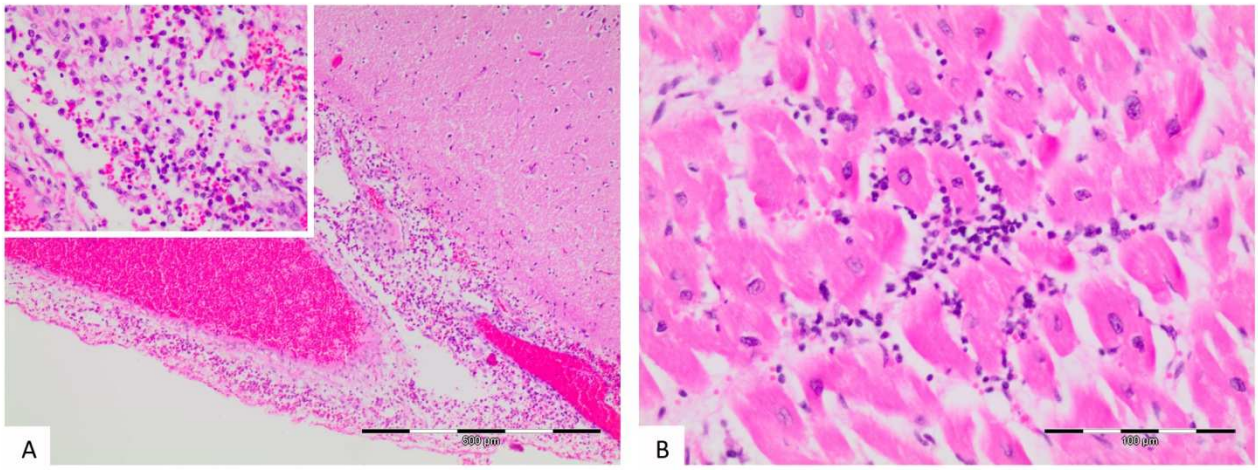


Figura 30: Descripción y diagnóstico histopatológico de las lesiones más relevantes observadas en meninges y corazón del ejemplar N5. A. Meningitis no supurativa. Severo infiltrado inflamatorio linfohistiocítico. Exudación de células inflamatorias, sanguíneas y material fibrilar *(Inset) (10x)*. **B. Miocarditis no supurativa.** Hipereosinofília de las fibras miocárdicas (necrosis) e infiltrado inflamatorio linfohistiocítico en el perimisio *(40x)*. ***(H&E).***

4.1.3.3 REPRODUCTORES

N13. Reproductor macho, mayor de 1 año con cuadro de caquexia y lesiones costrosas en piel de flancos y cuello.

Diagn. morf. macroscópico: *Bronconeumonía supurativa lobular aguda leve. Dermatitis hiperplásica con hiperqueratosis. Leve hidrotórax y moderado hidropericardio. Endocardiosis moderada y quistes hemáticos en válvula mitral. Gastritis catarral y congestión severa. Enteritis fibrinosa leve. Congestión en meninges.*

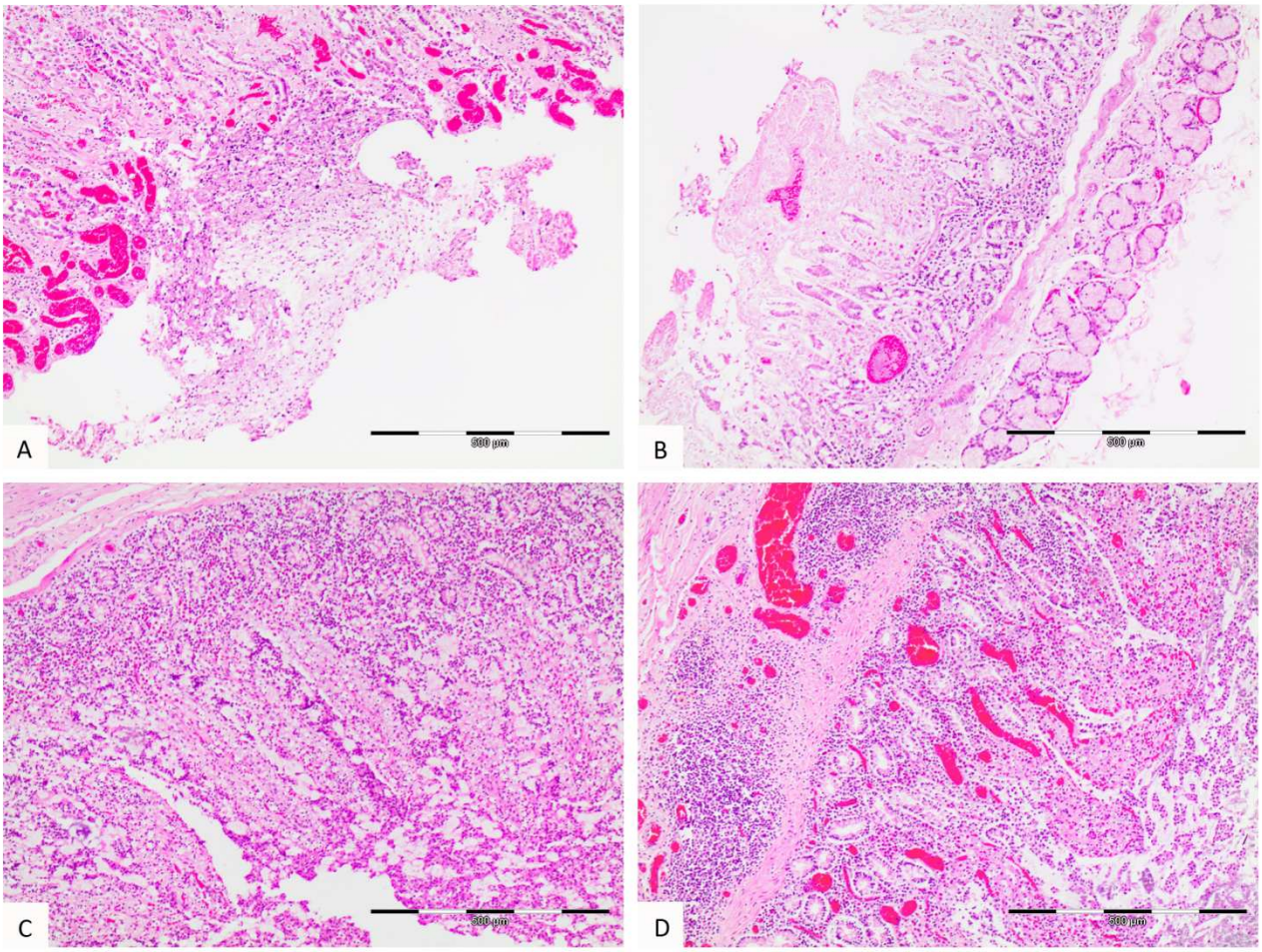


Figura 31: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en el aparato digestivo del ejemplar N13. A. Gastritis ulcerativa. Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario en lámina propia, con necrosis de la mucosa con desprendimiento del epitelio, células inflamatorias, epiteliales, moco y fibrina en luz gástrica *(10x).* **B-D. Enteritis linfoplasmocitaria en intestino delgado. B.** Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario en mucosa de duodeno *(10x).* **C.** Infiltrado linfoplasmocitario en mucosa de yeyuno con presencia en luz intestinal de células inflamatorias y epitelio desprendido *(10x).* **D.** Severa congestión e hiperemia en mucosa y submucosa de íleon con infiltrado linfoplasmocitario y eosinofílico. Células inflamatorias, células epiteliales desprendidas y grupos de bacterias en luz intestinal *(10x).* ***(H&E).***

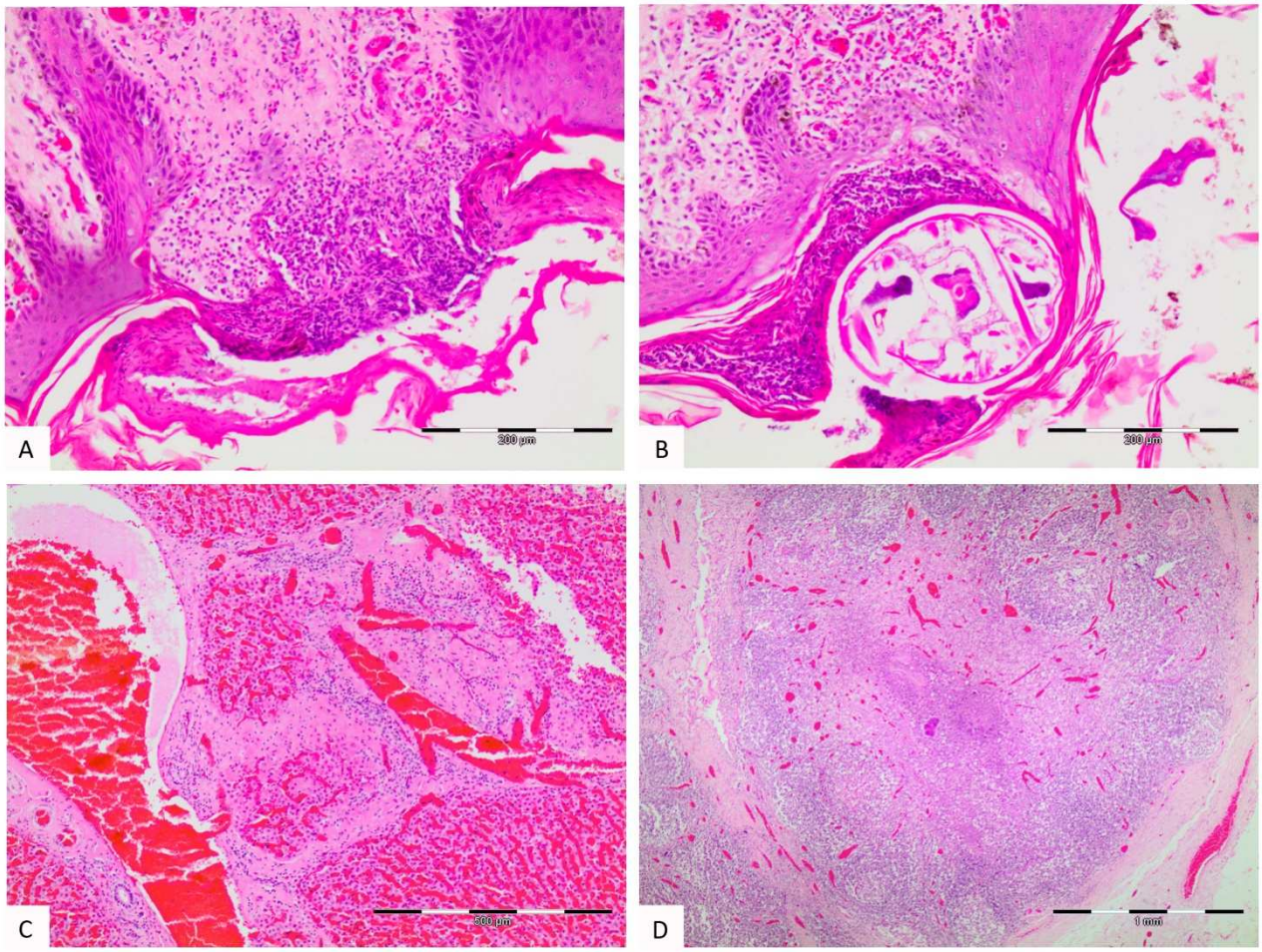


Figura 32: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes observadas en piel, hígado y tonsila del ejemplar N13. A. Severa dermatitis pustular con paraqueratosis multifocal. Abundante infiltrado inflamatorio eosinofílico en estratos profundos de la epidermis y en dermis superficial *(20x)*. **B. Dermatitis eosinofílica.** Estructuras parasitarias *(Sarcoptes scabiei)* en estrato córneo rodeado por restos celulares e infiltrado inflamatorio eosinofílico intersticial en dermis superficial *(20x)*. **C. Hepatitis perilobulillar subaguda crónica.** Congestión de vena centrolobulillar, sinusoides y espacio porta, con proliferación de tejido fibroso en septos interlobulillares y espacios porta con moderado infiltrado inflamatorio mixto *(10x)*. **D. Hiperplasia reactiva linfoide difusa y tonsilitis necrótica multifocal.** Congestión y necrosis multifocal, con infiltrado inflamatorio polimorfonuclear y colonias bacterianas *(4x)*. ***(H&E).***

N14. Reproductor macho >1 año con adelgazamiento progresivo.

Diagn. morf. macroscópico: *Neumonía intersticial difusa. Dermatitis pustular multifocal. Hidropericardio leve-moderado. Leve ascitis y peritonitis fibrinosa Enteritis fibrinosa leve-moderada con nematodos adultos. Nefritis intersticial crónica multifocal localmente extensiva.*

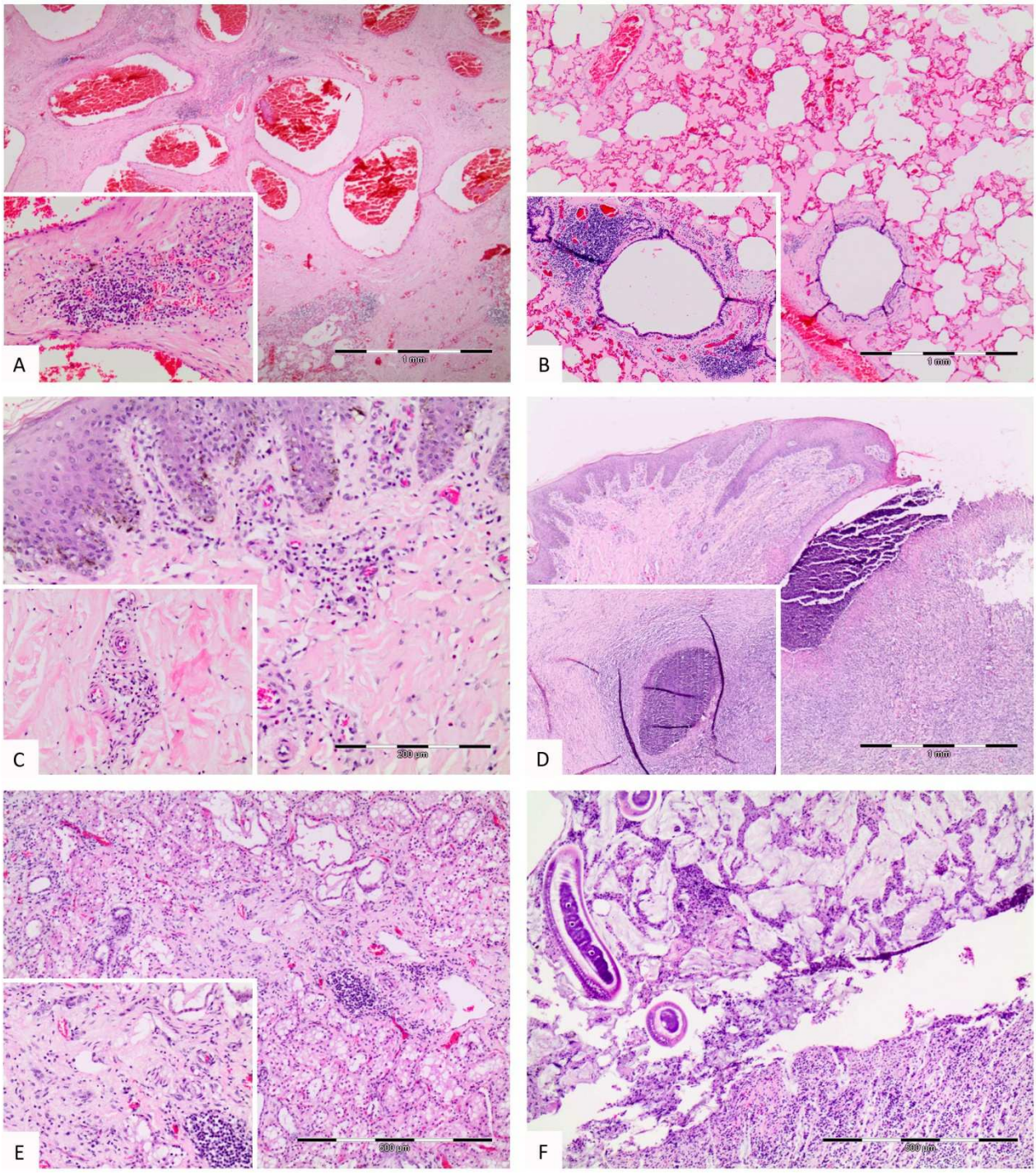


Figura 33: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas más relevantes en pulmón, piel, riñón e intestino observadas en el ejemplar N14. A y B. Fibrosis focal y edema pulmonar generalizado. A. Proliferación de tejido conectivo focal en parénquima pulmonar con severa neovascularización *(4x). Inset. Escaso infiltrado inflamatorio linfocítico.* **B.** Edema en luz alveolar e infiltrado inflamatorio linfocítico perivascular *(4x). Inset. Hiperplasia del BALT a nivel bronquiolar*. **C. Dermatitis eosinofílica perivascular.** Infiltrado inflamatorio linfocítico y eosinofílico perivascular en dermis superficial *(20x). Inset. Infiltrado eosinofílico perivascular en dermis profunda.* **D. Furunculosis severa.** Severo infiltrado mixto multifocal en dermis, extendiéndose hacia epidermis, asociado a severa destrucción de los folículos pilosos *(4x). Inset. Corte transversal de folículo piloso con furunculosis severa.* **E. Nefritis intersticial crónica.** Proliferación de tejido conectivo a nivel intersticial, con infiltrado inflamatorio linfocítico *(10x). Inset. Detalle de la fibrosis y foco de infiltrado inflamatorio.* **F. Enteritis catarral-eosinofílica.** Estructuras parasitarias compatibles con *Ascaris suum*, moco, células inflamatorias y epitelio descamado en luz intestinal. Infiltrado inflamatorio polimorfonuclear eosinofílico en lámina propia *(10x)*. ***(H&E).***

4.1.4 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Atendiendo a los hallazgos macroscópicos más frecuentemente observados en el sistema respiratorio, y teniendo en cuenta el posterior diagnóstico morfológico histopatológico caracterizando los distintos patrones de inflamación presentes a nivel pulmonar, se realizó estudios complementarios. Con el objetivo profundizar en el conocimiento de los posibles agentes etiológicos asociados, se realizó IHQ para detectar de Ags de Mh, PCV2 y PRRSv sobre los 14 animales con lesiones pulmonares de tipo inflamatorio.

El 43% (5) de los animales mostraron inmunorreacción para alguno de los agentes infecciosos analizados mediante IHQ, no existiendo evidencias de procesos de coinfección (Gráfico 4).

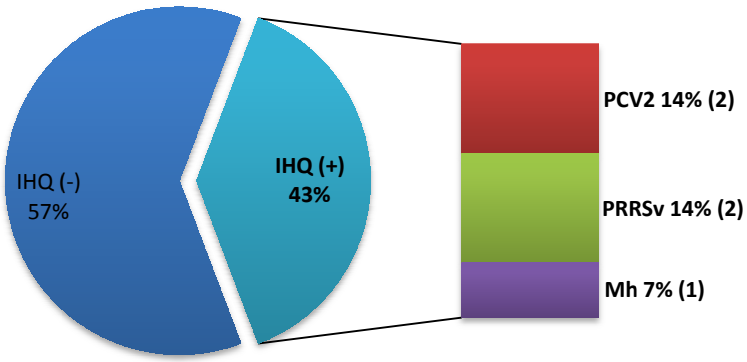


Gráfico 4: **Detección de antígenos frente a Mh, PCV2 y PRRSv mediante IHQ.** Porcentaje de animales con inmunorreacción frente a antígenos de algunos de los agentes estudiados.

La identificación de los Ags de **Mh** en pulmón, se observó como una inmunorreacción granular en la superficie del epitelio respiratorio de bronquios y bronquiolos en un 7% de los animales. Conjuntamente, se observó inmunomarcaje en células epiteliales desprendidas presentes en las vías aéreas (Fig. 34A y B, N8).

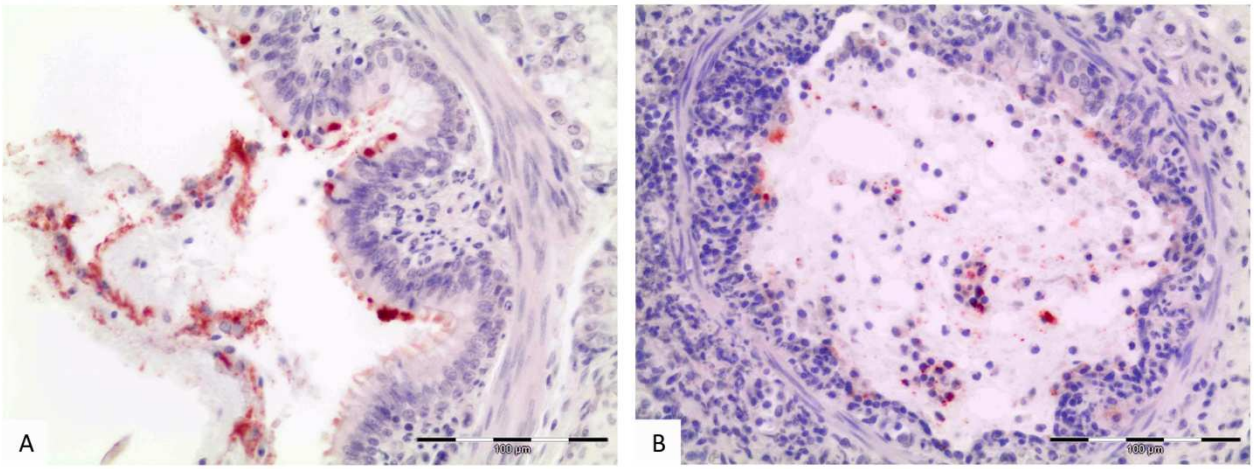


Figura 34: **Inmunohistoquímica frente a Mh en el ejemplar N8.** Inmunorreacción granular frente a Mh en la superficie del epitelio respiratorio y en células desprendidas e inflamatorias en luz bronquial (A) y bronquiolar (B). *(Método SBP, AEC; A y B 40x).*

De forma general, independientemente del órgano estudiado, las células diana donde se observó inmunorreacción frente a **PCV2,** fueron las células de la línea histiocítica-macrofágica, que presentaron inmunomarcaje granular intracitoplasmático de color rojo en un 14% (2) de los animales analizados, así como en células gigantes multinucleadas (sincitios) y en cuerpos de inclusión.

En estos ejemplares se detectó Ags en pulmón, LNs, tonsila, bazo, placas de Peyer, timo, riñón, intestino y SNC con una intensidad que varió desde leve a intensa.

En ***pulmón,*** se observó inmunorreacción en macrófagos alveolares y células histiocíticas en paredes alveolares; macrófagos activados, células binucleadas y gigantes multinucleadas en el exudado de la luz alveolar y de las vías aéreas y en células inflamatorias presentes en el epitelio respiratorio y en el BALT (Fig. 35 y 36, A).

En los órganos hemolinfoides también se detecctó una intensa inmunorreacción frente a Ags de PCV2, principalmente en timo, linfonodos, bazo, tonsila y en intestino a nivel de placas de Peyer.

En ***timo*** se observó inmunomarcaje en macrófagos y células gigantes multinucleadas (sincitios) a nivel medular (Fig. 35 y 36, B) y en macrófagos presentes en la corteza tímica (Fig. 36B).

En ***LNs,*** éste se detectó, a nivel centrofolicular o de forma difusa por el parénquima, como una reacción granular de color rojo, principalmente en el citoplasma y, en menor medida, en el núcleo de células histiocíticas y dendríticas, células gigantes multinucleadas (sincitio) y células de naturaleza linfoide; observándose, en ocasiones, inmunomarcaje de cuerpos de inclusión (Fig. 35 y 36, C).

A nivel de ***bazo***, el Ag de PCV2 se detectó principalmente en el citoplasma de células histiocítica, a nivel de folículos linfoides y vainas linfoides periarteriolares; así como, en las abundantes células gigantes multinucleadas (sincitios) presentes y en menor medida, en las células circulantes en pulpa esplénica roja (Fig. 35 y 36, D).

En ***tonsila***, la presencia de Ags de PCV2 se visualizó mayoritariamente en el citoplasma de células histiocíticas, células dendríticas y células gigantes multinucleadas (sincitios), localizadas en folículos linfoides, así como en macrófagos presentes en el tejido difuso interfolicular, alrededor de criptas tonsilares y en epitelio (Fig. 35 y 36, E).

En ***intestino***, se detectó inmunorreación frente a PCV2 en macrófagos, células gigantes multinucleadas y ocasionalmente en cuerpos de inclusión localizados en las placas de Peyer, así como en el infiltrado inflamatorio presente en la lámina propia de intestino delgado y grueso (Fig. 35 y 36, F).

En ***riñón***, PCV2 se detectó, principalmente, en epitelio de túbulos renales (Fig. 37, A y B) y en células histiocíticas y de la línea linfocítica presentes en los focos de infiltrado inflamatorio (Fig. 37B). También se observó inmunomarcaje en células endoteliales (Fig. 37B).

En ***SNC,*** fue posible observar inmurreacción en la pared vascular a nivel de las células inflamatorias y endoteliales en los procesos de vasculitis observados en cerebro (Fig. 37C) y en células endoteliales de vasos sanguíneos con procesos de hemorragia asociados, presentes en cerebelo (Fig. 37D).

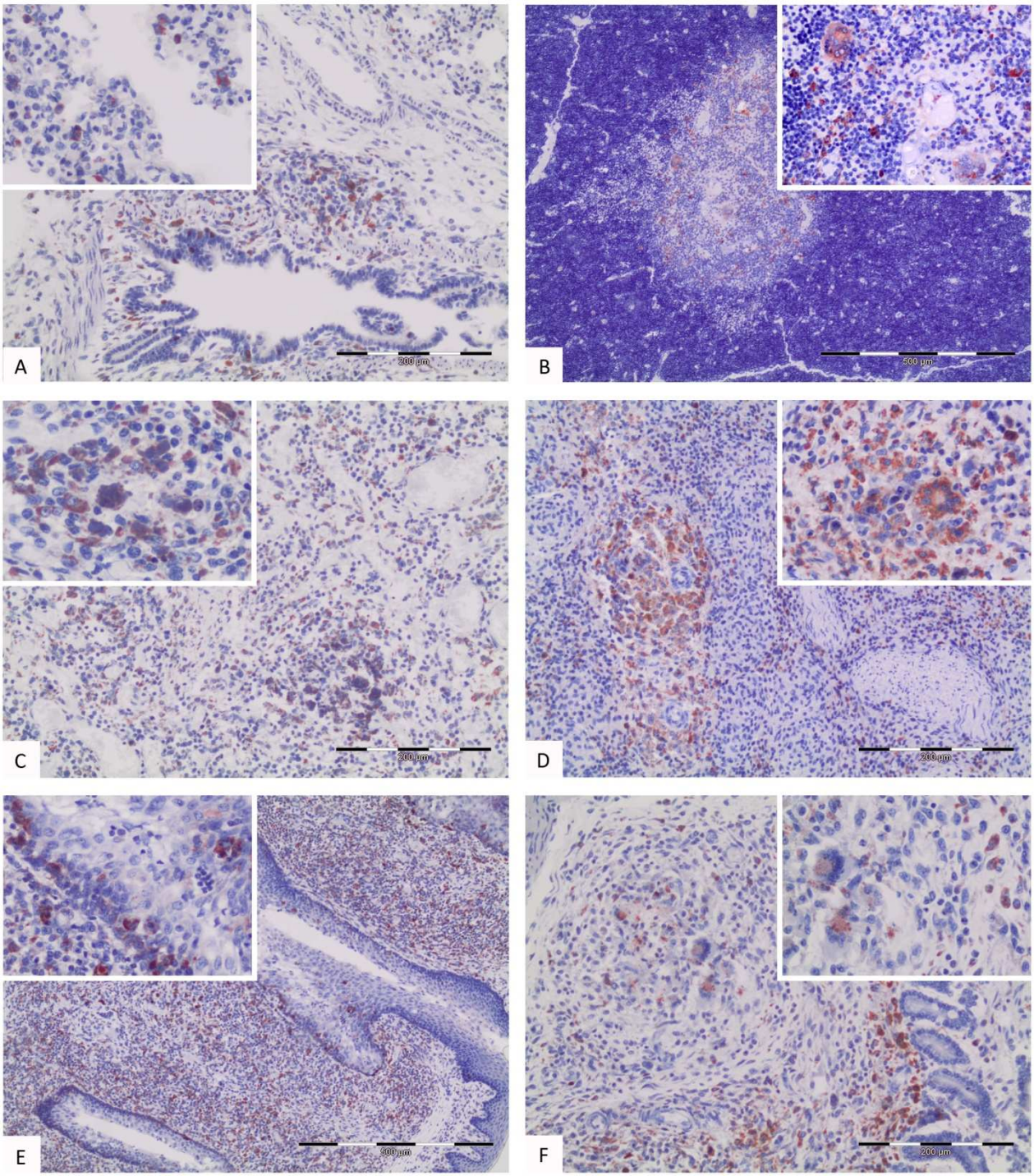


Figura 35: Inmunohistoquímica frente a PCV2 en pulmón y órganos linfoides del ejemplar N4. A. Pulmón. Inmunorreacción en células inflamatorias en el epitelio respiratorio y BALT *(20x)*. *Inset. Inmunorreacción en macrófagos alveolares y células linfocíticas en paredes alveolares*. **B. Timo.** Inmunorreacción en células histiocíticas y sincitios a nivel medular *(10x). Inset. Detalle de inmunorreacción en sincitios*. **C. LN inguinal profundo.** Inmunorreacción en células histiocíticas, sincitios y en células de naturaleza linfoide, de distribución difusa *(20x). Inset. Inmunomarcaje ocasional en cuerpos de inclusión.* **D. Bazo.** Inmunorreacción en células histiocíticas y sincitios en vainas linfoides periarteriolares y en células circulantes en pulpa esplénica roja *(20x). Inset. Detalle de histiocitos y sincitios positivos en folículo linfoide.* **E. Tonsila.** Inmunorreacción en células histiocíticas, células dendríticas y sincitios en folículos linfoides y células histiocíticas en tejido difuso interfolicular *(10x). Inset. Detalle de inmunomarcaje en células histiocíticas en criptas tonsilares*. **F. Intestino. Placas de Peyer.** Inmunorreación en células histiocíticas y sincitios en placas de Peyer, así como en el infiltrado inflamatorio presente en lámina propia *(20x). Inset. Detalle de sincitios con inmunomarcaje.* ***(Método SBP, AEC).***

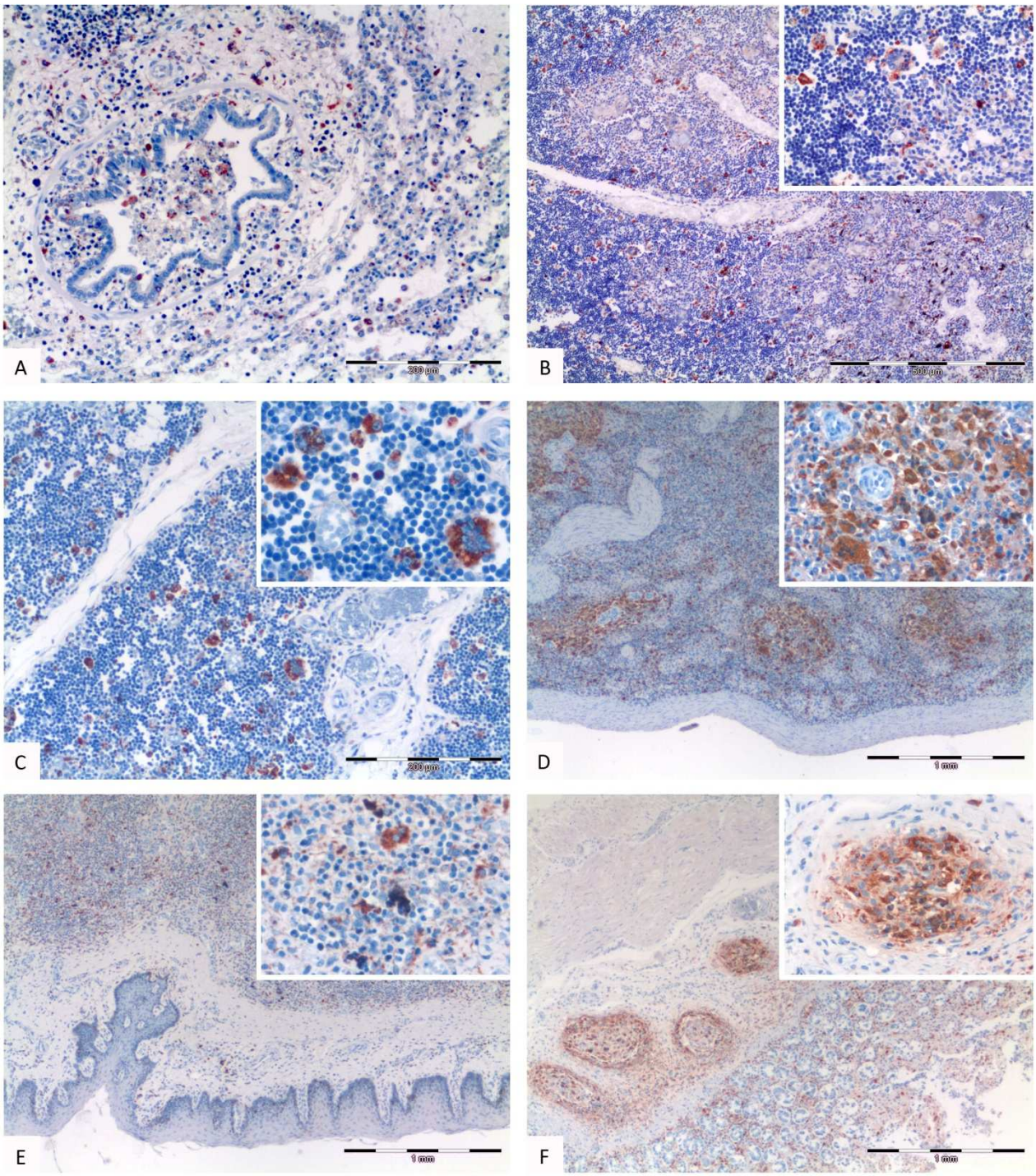


Figura 36: **Inmunohistoquímica frente a PCV2 en pulmón y órganos linfoides del ejemplar N16. A. Pulmón.** Inmunorreacción en células linfocíticas e histiocíticas en paredes alveolares, en macrófagos alveolares y sincitios en exudado de vías aéreas y luz alveolar y en células linfocíticas en epitelio respiratorio *(20x)*. **B. Timo.** Inmunorreacción en células histiocíticas y sincitios en médula y corteza *(10x)*. **C. LN inguinal profundo.** Inmunorreacción intracitoplasmática en células histiocíticas, sincitios y ocasionalmente, en cuerpos de inclusión y en células de naturaleza linfoide, de distribución difusa *(20x)*. *Inset. Detalle de sincitio con inmunomarcaje.* **D. Bazo.** Inmunorreacción intracitoplasmática en células histiocíticas y sincitio en las vainas linfoides periarteriolares y en células circulantes en pulpa esplénica roja *(4x). Inset. Detalle de inmunomarcaje en vainas linfoides periarteriolares*. **E. Tonsila.** Inmunorreacción en células histiocíticas, células dendríticas y sincitios y ocasionalmente, en cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en folículos linfoides y células histiocíticas en tejido difuso interfolicular *(4x). Inset. Detalle de inmunomarcaje en cuerpos de inclusión*. **F. Intestino, placas de Peyer.** Inmunorreación en células histiocíticas, sincitios y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en placas de Peyer *(Inset)*, así como en infiltrado inflamatorio en lámina propia *(4x)*. ***(Método SBP, AEC).***

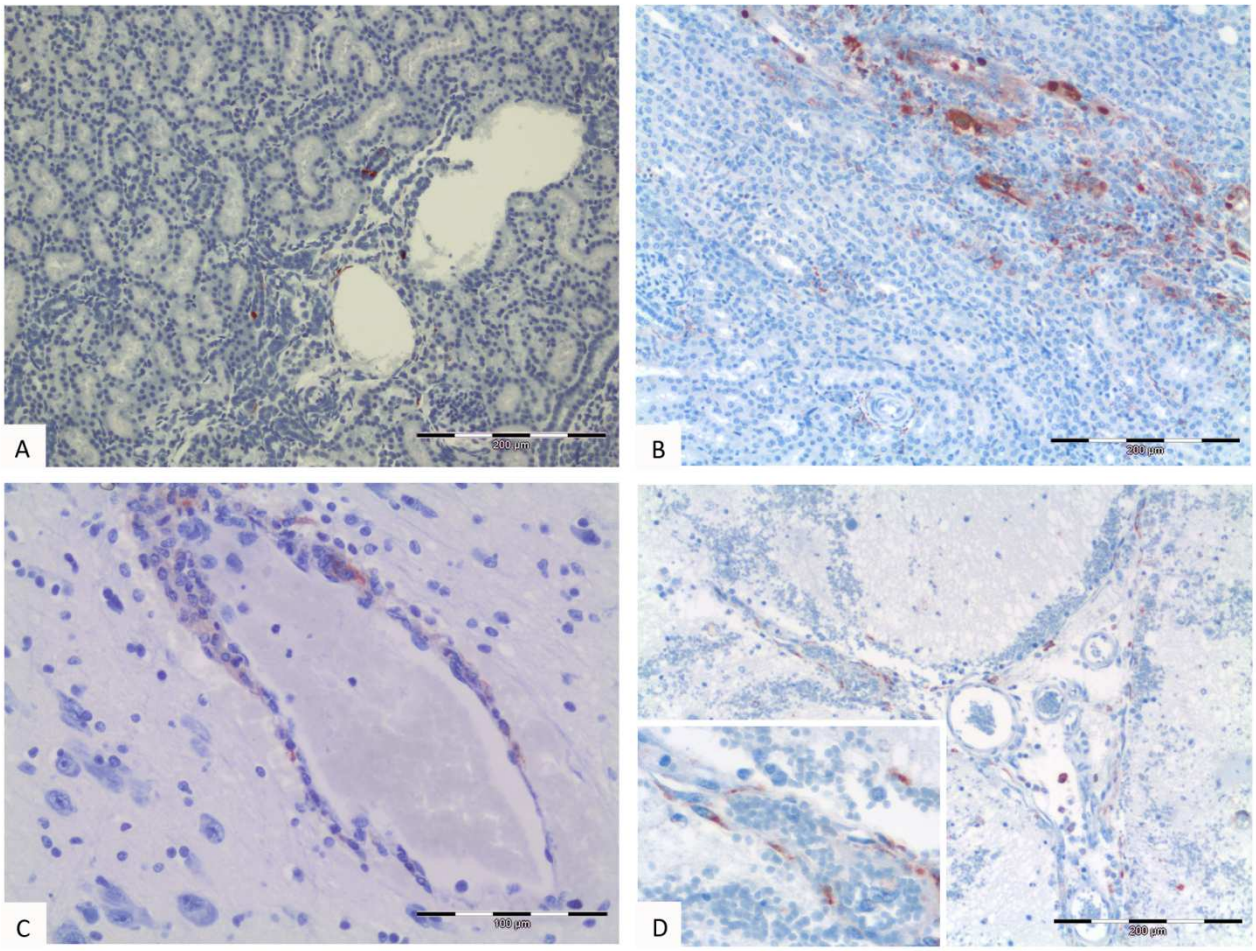


Figura 37: IHQ frente a PCV2 en riñón y SNC de los ejemplares N4 y N16. A y B. Riñón. Inmunorreación en epitelio de túbulos renales (A, N4) y en células endoteliales y células histiocíticas y de la línea linfocítica presentes en los focos de infiltrado inflamatorio (B, N16) *(20x)*. **C y D. SNC.** Inmunorreacción en células endoteliales e inflamatorias de vasos sanguíneos de cerebro con procesos de vasculitis (C, N4) y en células endoteliales asociadas a procesos de hemorragia presentes en cerebelo (D, N16) *(C 40x; D 20x). Inset C. Detalle de inmunomarcaje en células endoteliales*. ***(Método SBP, AEC).***

En la IHQ realizada frente a Ags de **PRRSv**, se observó inmunorreacción en un 14% (2) de los casos en pulmón, LNs, bazo y tonsila. En ***pulmón*** se detectó inmunorreacción débil ocasional en macrófagos alveolares presentes en el exudado de luces alveolares (Fig. 38, A y B). En ***LNs, bazo y tonsila***, esta inmunorreacción fue más intensa, observándose en citoplasma de histiocitos y células dendríticas de forma difusa (Fig. 38C). En ***intestino***, en macrófagos localizados en el infiltrado inflamatorio presente en la lamina propia de las vellosidades intestinales (Fig. 38D).

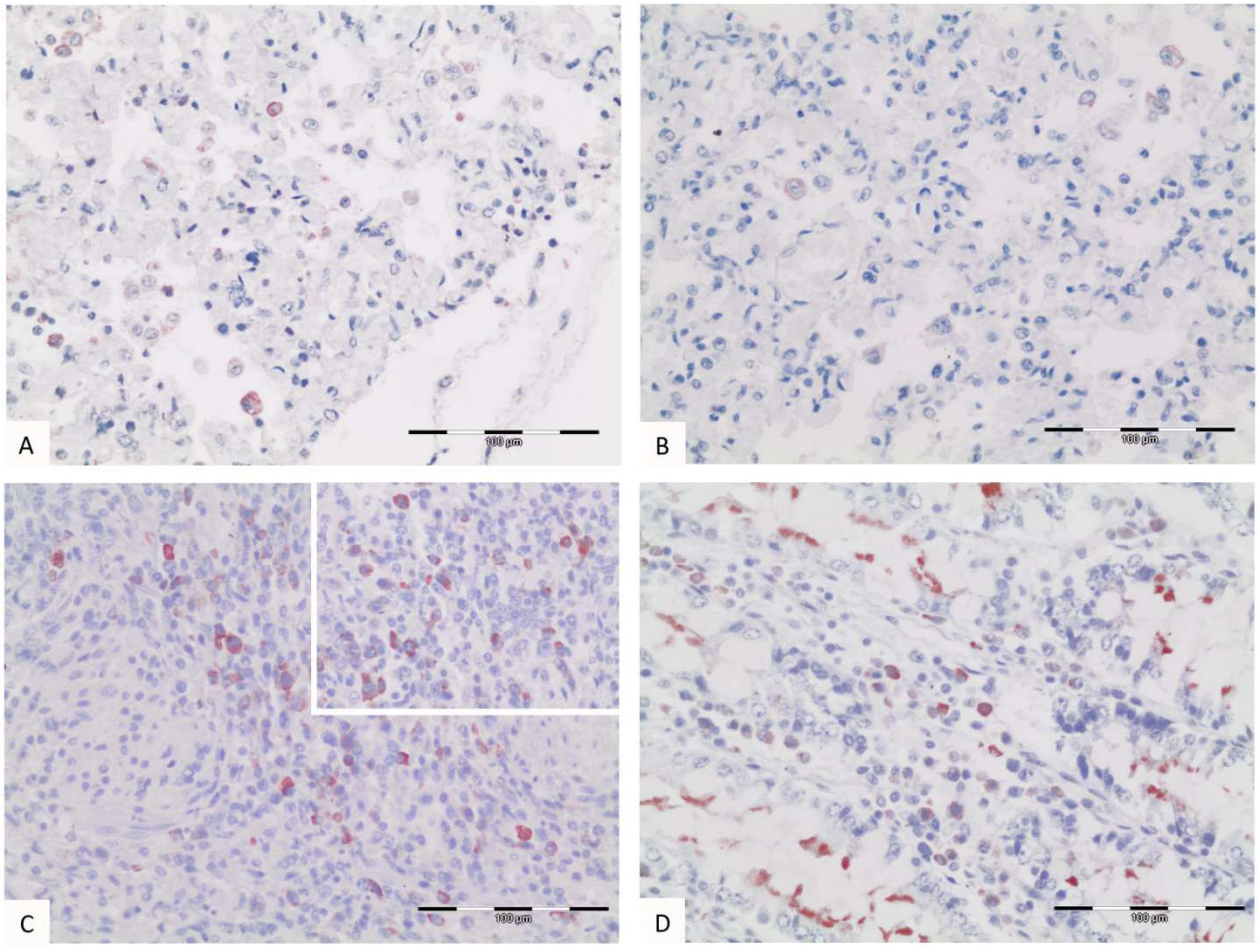


Figura 38: Inmunohistoquímica frente a PRRSv en pulmón, bazo e intestino de los ejemplares N22 y N23. A y B. Pulmón. Inmunorreacción intracitoplasmática débil en macrófagos alveolares presentes en el exudado de luz alveolar. **C. Bazo.** Inmunorreacción intracitoplasmática en células de la línea histiocítica, de distribución difusa. **D. Intestino.** Inmunorreacción en infiltrado inflamatorio presente en la lámina propia de intestino. ***(Método SBP, AEC; A-D 40x).***

4.1.5 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Del ejemplar N8 se realizó análisis bacteriológico en muestras de intestino, hígado y LNs Ms, llevando a cabo una bacterioscopía con tinción de Gram, cultivo y aislamiento de las colonias bacterianas. Éstas fueron identificadas con API 20E Biomeriex como *Salmonella enterica* subespecie *Enterica* y tipificadas como *Salmonella enterica* subespecie *Enterica* serotipo *Enteritidis 9,12: g.m.* (Laboratorio Nacional de Referencia - Salmonelosis).

4.1.6 RESUMEN

Tabla 16: Resumen del diagnóstico morfológico (macroscópico y microscópico) y diagnóstico etiológico (mediante IHQ o microbiología) de los animales del estudio (n=14).

ID	DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO		DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO
	MACROSCÓPICO	MICROSCÓPICO	
N4	*Bronconeumonía supurativa leve a moderada multifocal y severa neumonía intersticial.* Severo edema intersticial. Leve a moderada ascitis e hidropericardio. Pleuritis fibrinosa moderada. Peritonitis fibrinosa leve a moderada. Hepatitis fibrosa leve multifocal. Hemorragias multifocales moderadas en aurículas. Linfoadenomegalia generalizada de moderada a severa. Congestión severa generalizada y hemorragia focal en meninge de hemisferio derecho.	*Neumonía broncointersticial leve-moderada. Neumonía intersticial severa.* Pericarditis fibrosa. Perihepatitis fibrinopurulenta severa. Hepatitis linfohistiocítica periportal multifocal y fibrosa. Gastroenteritis eosinofílica moderada Miocarditis no supurativa. Severa depleción linfoide en bazo, LNs, tonsila y placas de Peyer con histiocitosis esplénica, en placas de Peyer y timo con sincitos y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos. Meningoencefalitis no supurativa con vasculitis moderada.	PCV2
N7	*Bronconeumonía supurativa moderada.* Peritonitis fibrinosa leve. Pericarditis fibrosa moderada. Enteritis catarral moderada a severa. Artritis fibrosa (cápsula articular de codo izquierdo y rodilla derecha).	*Neumonía broncointersticial moderada***.** Pericarditis fibrosa moderada. Hepatitis linfohistiocítica multifocal. Enteritis catarral-linfoplasmocitaria. Histiocitosis esplénica. Nefritis intersticial leve multifocal. Artritis fibrinosa subaguda-crónica.	
N8	*Bronconeumonía supurativa focal leve.* Necrosis hepática severa. Estasis de vesícula biliar. Tiflitis y colitis fibrinonecrótico multifocal trasmural severa. Linfoadenomegalia severa de LN mesentérico. Tonsilitis fibrinonecrótica focal bilateral. Ictericia.	*Bronconeumonía fibrinosupurativa subaguda severa. Neumonía Intersticial subaguda moderada.* Severa hepatitis necrótica. Ileitis fibrinonecrótica moderada. Severa tiflitis y colitis fibrinonecrótica. Moderada linfadenitis y tonsilitis fibrinonecrótica. Depleción linfoide esplénica e histiocitosis moderada.	Mh *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis*
N9	*Bronconeumonía supurativa subaguda-crónica Bronconeumonía fibrinonecrótica focal aguda-subaguda.* Pleuritis fibrosa multifocal moderada-severa. Pericarditis fibrosa moderada-severa. Peritonitis fibrinosa leve. Congestión hepática severa. Linfoadenomegalia generalizada moderada. Congestión en meninges.	*Neumonía broncointersticial subaguda crónica severa. Bronconeumonía fibrinopurulenta aguda.* Pleuritis fibrosa subaguda-crónica moderada. Pericarditis fibrosa severa. Serositis fibrinosa moderada de estómago e intestino. Necrosis hepática centrolobulillar. Enteritis necrótica linfohisticítica. Nefritis intersticial leve multifocal y CID. Depleción linfoide esplénica, Hiperplasia linfoide reactiva en LNs. Meningitis no supurativa moderada y hemorragia multifocal moderada a severa en encéfalo.	
N10	*Bronconeumonía supurativa crónica.* Peritonitis fibrinosa. Congestión hepática moderada. Hepatitis fibrosa leve.	*Neumonía broncointersticial.* Necrosis hepática centrolobulillar moderada-severa. Nefritis intersticial multifocal moderada. Hiperplasia linfoide reactiva en LNs	
N11	*Bronconeumonía supurativa.* Pleuritis, pericarditis y peritonitis fibrinosa moderada. Linfoadenomegalia moderada. Congestión en meninges.	*Bronconeumonía purulenta.* Severa pleuritis fibrinosupurativa subaguda-crónica. Severa pericarditis fibrinosupurativa subaguda-crónica. Severa perihepatitis fibrinopurulenta. Severa peritonitis fibrinosa. Gastritis fibrinosa. Enteritis fibrinonecrótica. Nefritis intersticial leve multifocal. Miocarditis subepicárdica purulenta. Depleción linfoide esplénica y en LNs. Encefalitis supurativa.	
N12	*Bronconeumonía supurativa subaguda-crónica y neumonía intersticial.* Pericarditis fibrinosa moderada. Peritonitis fibrinosa moderada-severa.	*Bronconeumonía purulenta leve. Neumonía intersticial moderada*. Pleuritis fibrosa moderada-severa. Pericarditis fibrinosa Hiperplasia linfoide reactiva en LNs.	

continuación

ID	DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO		IHQ
	MACROSCÓPICO	MICROSCÓPICO	
N16	*Bronconeumonía supurativa lobular subaguda moderada. Neumonía intersticial difusa y edema intersticial moderado a severo.* Pleuritis fibrinosa leve-moderada. Hidropericardio. Ascitis con peritonitis fibrinosa leve. Hepatitis fibrosa multifocal parasitaria severa. Nefritis intersticial leve. Linfoadenomegalia generalizada de moderada a severa. Congestión generalizada y hemorragia focal en meninge de hemisferio derecho. Hemorragias petequiales y equimosis severa en cerebelo. Hemorragias petequiales leve en sustancia blanca de cerebro.	*Neumonía broncointersticial moderada. Neumonía Intersticial severa. Edema intersticial severo.* Pleuritis fibrinosa moderada. Gastroenteritis eosinofílica moderada. Severa hepatitis fibrosa eosinofílica. Nefritis intersticial leve-moderada multifocal. Depleción linfoide severa en bazo, LNs, tonsila y placas de Peyer e histiocitosis severa en bazo, LNs, tonsila y timo con sincitios y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos basófilos. Meningoencefalitis no supurativa leve-moderada y vasculitis en cerebro.	PCV2
N17	*Neumonía intersticial leve.* Edema subcutáneo. Hidrotórax leve-moderado. Hidropericardio leve-moderado. Ascitis y peritonitis fibrinosa leve. Congestión hepática severa. Linfoadenomegalia moderada-severa de LNs inguinal superficial, prefemoral, preescapular y mesentérico. Cardiomiopatía dilatada moderada-severa. Necrosis de miocardio multifocal. Congestión en meninges.	*Neumonía intersticial leve. Congestión pulmonar severa con hemorragia multifocal.* Pleuritis fibrosa moderada-severa. Severa necrosis hepática centrolobulillar. Gastritis linfoplasmocitaria moderada. Enteritis necrótica moderada. Nefritis intersticial leve-moderada multifocal. Miocarditis no supurativa leve multifocal con necrosis de miocardiocitos. Hiperplasia linfoide reactiva en LNs. Linfadenitis y tonsilitis purulenta.	
N22	*Neumonía intersticial aguda moderada.* Peritonitis fibrinosa leve-moderada. Leve edema subcutáneo. Linfoadenomegalia moderada-severa generalizada. Congestión en meninges.	*Neumonía intersticial modera y leve neumonía broncointersticial.* Hepatitis fibrosa leve-moderada. Enteritis linfoplasmocitaria. Leve nefritis intersticial. Hiperplasia linfoide reactiva moderada en LNs.	PRRSv
N23	*Bronconeumonía supurativa lobular aguda-subaguda moderada.* Hidrotórax e hidropericardio leve. Peritonitis fibrinosa leve-moderada. Linfoadenomegalia moderada-severa generalizada. Tonsilitis supurativa.	*Neumonía broncointersticial y neumonía intersticial moderada.* Pleuritis fibrosa leve. Hepatitis fibrosa eosinofílica moderada. Enteritis necrótica linfoplasmocitaria moderada. Hiperplasia linfoide reactiva moderada en LNs. Tonsilitis purulenta.	PRRSv
N5	*Bronconeumonía supurativa leve-moderada. Neumonía intersticial moderada.* Máculas y pápulas en extremidades posteriores, abdomen y tórax. Leve edema subcutáneo. Úlceras gástricas en pars glandular. Nefritis intersticial multifocal diseminada. Linfoadenomegalia moderada-severa generalizada.	*Neumonía broncointersticial moderada. Neumonía intersticial severa.* Severa vasculitis necrotizante en dermis. Dermatitis pustular subcorneal parasitaria *(Sarcoptes scabiei).* Hepatitis linfohistiocítica. Gastritis ulcerativa. Enteritis linfohistiocítica moderada. Glomerulonefritis fibrinonecrotizante. Nefritis intersticial multifocal. Miocarditis no supurativa. Severa depleción linfoide en bazo, LNs y placas de Peyer. Severa histiocitosis en bazo, LNs y placas de Peyer con sincitios. Meningitis no supurativa.	
N13	*Bronconeumonía supurativa lobular aguda leve.* Dermatitis hipertrófica-hiperplásica con paraqueratosis**.** Leve hidrotórax y moderado hidropericardio. Gastritis catarral y congestión severa. Enteritis fibrinosa leve. Endocardiosis moderada-severa y quistes hemáticos en válvula mitral. Congestión en meninges.	Bronconeumonía purulenta. Severa dermatitis pustular con paraqueratosis multifocal. Dermatitis eosinofílica Hepatitis perilobulillar subaguda crónica. Gastritis ulcerativa. Enteritis linfoplasmocitaria en intestino delgado. Hiperplasia reactiva linfoide en tonsila y tonsilitis necrótica multifocal. Miocarditis no supurativa. Endocardiosis fibrosa.	
N14	Neumonía intersticial difusa. Dermatitis pustular multifocal. Hidropericardio leve-moderado. Leve ascitis y peritonitis fibrinosa Enteritis fibrinosa leve-moderada con nematodos adultos. Nefritis *intersticial crónica multifocal localmente extensiva.*	Fibrosis pulmonar focal y edema pulmonar generalizado. Dermatitis eosinofílica perivascular. Severa furunculosis. Enteritis catarral-eosinofílica parasitaria. Nefritis intersticial crónica. Depleción linfoide esplénica. Hiperplasia linfoide reactiva en LNs y tonsila.	

4.2 ESTUDIO 2: ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO EN ANIMALES SACRIFICADOS EN MATADERO

4.2.1 ESTUDIO MACROSCÓPICO

Se valoraron los pulmones de 30 animales (33%, 10 **lechones**; 50%, 15 **animales de cebo** y 17%, 5 **reproductores**) mediante inspección visual, palpación e incisión del parénquima. Además se inspeccionaron órganos hemolinfoides (bazo, tonsila y LNTb), hígado y riñón, en donde los agentes involucrados en el desarrollo del PRDC pueden ejercer también su acción patógena, según viene referenciado en numerosos estudios.

Tras la inspección macroscópica de los órganos, se observó en los **pulmones**, en lóbulos craneales y medio, áreas de consolidación craneoventral, deprimidas, delimitada a los lobulillos, de coloración rojo oscuro a gris y extensión discreta *(bronconeumonía supurativa)* en un 10% (3) de los animales (3 animales de cebo) (Fig. 39A). En el **hígado**, se observaron lesiones multifocales, mal delimitada, planas, irregulares y tamaño variable, blanquecinas *(hepatitis fibrosa parasitaria o hígado con "manchas de leche"*) en el 23% (7) de los animales (5 animales de cebo, 2 lechones) (Fig. 39C), acompañadas en un caso (3%) por áreas multifocales, circulares, de pequeño tamaño, bien delimitadas, sobreelevadas y de color rojo oscuro *(hemorragias)* (Fig. 39B). En el **riñón,** se observaron lesiones multifocales diseminadas, puntiforme, blanquecinas, que al corte se extendían en profundidad *(nefritis intersticial)* en un 23% (7) de los animales (6 animales de cebo, 1 lechón) (Fig. 39D).

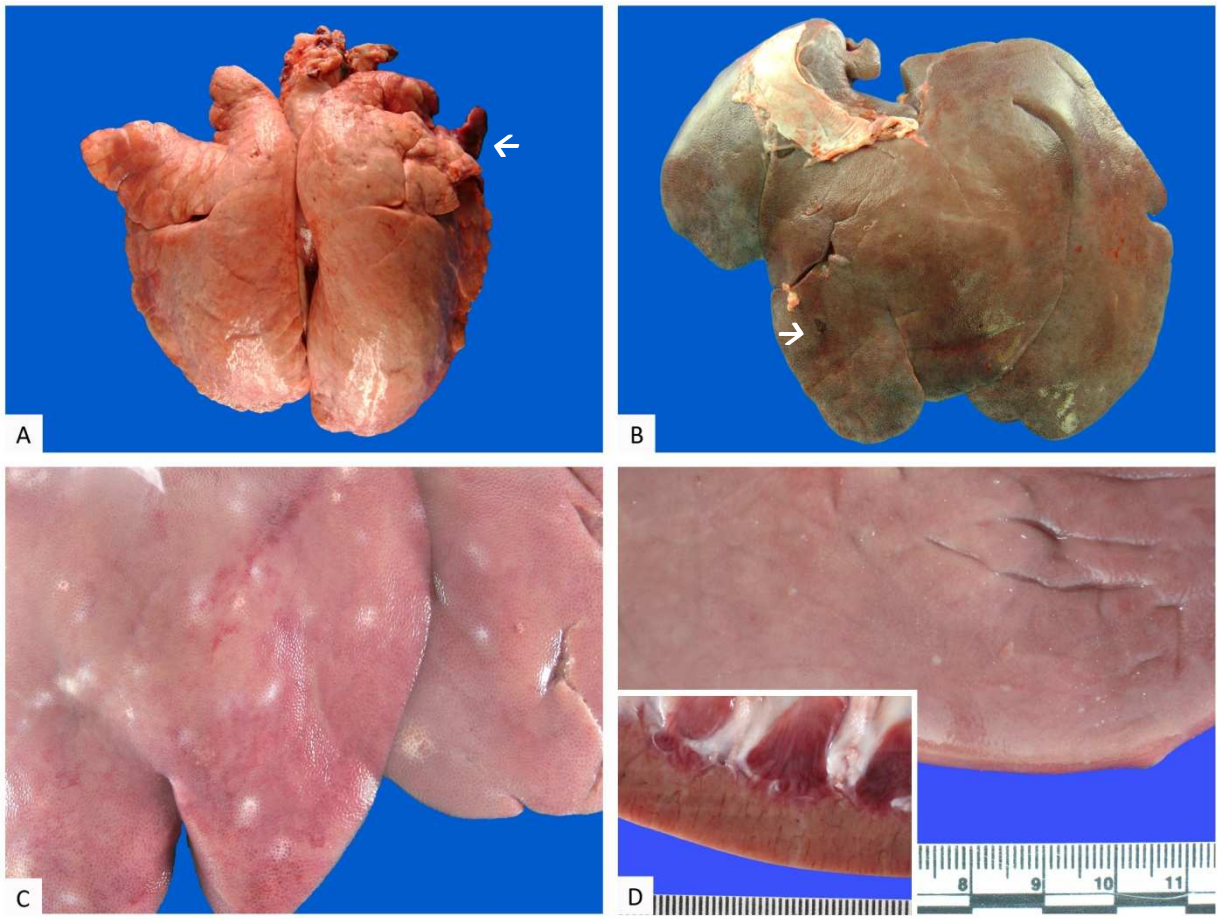


Figura 39: Diagnóstico morfológico de las lesiones macroscópicas observadas en pulmón e hígado. A y B. Pulmón. Bronconeumonía supurativa discreta *(flecha)* (B, CNC3). **B y C. Hígado.** Hemorragias multifocales *(flecha)* (B, CNC2). Hepatitis fibrosa o "manchas de leche" multifocales (C, CNC3). **D. Riñón.** Nefritis intersticial (CNC2). *Inset. Corte.*

4.2.2 ESTUDIO MICROSCÓPICO

Se realizó estudio histopatológico de las muestras de pulmón y de órganos hemolinfoides (bazo, tonsila y LNTb), riñón e hígado tomadas en matadero.

Del total de órganos inspeccionados, se observó algún tipo de lesión microscópica en **pulmón** del 100% de los animales. En el caso de los órganos hemolinfoides, se observaron lesiones en el **bazo** del 53% de los animales de cebo y en el 100% de los reproductores. En **tonsila** presentaron lesiones el 93% de los animales de cebo y el 100% de los reproductores. Finalmente en el **LNTb**, el 80% de los lechones, 53% de los animales de cebo y 20% de los reproductores presentaron lesiones microscópicas. Por último, en **hígado** el 100% de los animales presentaron algún tipo de lesión y en **riñón** el 50% de los lechones, el 100% de los animales de cebo y el 60% de los reproductores (Tabla 17).

Tabla 17: Porcentaje de animales con lesiones microscópicas en los distintos órganos inspeccionados. ** Órganos no inspeccionados en los lechones.

ÓRGANOS INSPECCIONADOS	EJEMPLARES		
	LECHONES (N=10)	CEBO (N=15)	REPRODUCTORES (N=5)
Pulmón	*100 (10)*	*100 (15)*	*100 (5)*
LNTb	80 *(8)*	53 *(8)*	20 *(1)*
Tonsila	**	93 *(14)*	100 *(5)*
Bazo	**	53 *(8)*	100 *(5)*
Hígado	100 *(10)*	100 *(15)*	100 *(5)*
Riñón	50 *(5)*	100 *(15)*	60 *(3)*

4.2.2.1 DESCRIPCIÓN Y DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO DE LAS LESIONES MICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN PULMÓN

Las lesiones microscópicas observadas en pulmón fueron: exudado inflamatorio de tipo polimorfonuclear neutrofílico en vías aéreas y/o luz alveolar y engrosamiento de las paredes alveolares por la proliferación de neumocitos tipo II y exudado de tipo mononuclear en luz alveolar *(neumonía broncointersticial)* (Fig. 40, A y B). También fue posible observar a nivel peribronquial, peribronquiolar o perivascular desde infiltrado inflamatorio mononuclear linfocítico/linfoplasmocitario, invadiendo en ocasiones la capa muscular de la mucosa de los bronquios o bronquiolos, a proliferación de varios folículos linfoides afectando áreas extensas llegando a ocluir la luz de las vías aéreas *(hiperplasia del BALT)* (Fig. 40, C-F). Además, se observó engrosamiento de las paredes alveolares por la presencia de infiltrado inflamatorio mononuclear linfocítico/linfoplasmocitario *(neumonía intersticial)* (Fig. 40, G) acompañado en ocasiones por macrófagos espumosos, células binucleadas (CBN) o células gigantes multinucleadas (CGMN) en luz alveolar e hiperplasia de neumocitos tipo II (Fig. 40, H). También se observó infiltrado inflamatorio focal mixto con predominio de polimorfonucleares eosinófilos *(neumonía eosinofílica)* con proliferación de tejido conectivo en algún caso (Fig. 40, I y J). Otras lesiones observadas fueron: edema, hemorragia, congestión y fibrosis en septos interlobulillares.

Así, del total de animales inspeccionados en matadero, el 47% (14) de los animales presentaron lesiones de *neumonía broncointersticial* de leve (17%) a moderada (30%). La *hiperplasia del BALT* se observó en un 77% de los animales; siendo leve (40%), moderada (30%) y severa (7%). Las lesiones de *neumonía intersticial* se presentaron en un 67%, de leve (37%) a moderada (30%), y de *neumonía eosinofílica* en un 10% de los animales, siendo leve en todos ellos. Otras lesiones observadas fueron: atelectasia leve en un 7% de los animales, enfisema en un 27% de leve (3%) a moderado (24%), edema en un 33% de leve (23%) a moderado (10%), hemorragia en un 33% de los animales, siendo de leve (3%) a moderada (30%); congestión en un 70%, de leve (10%) a moderada (53%) y finalmente fibrosis de septos en un 47% de los animales, de leve (27%) a moderada (20%).

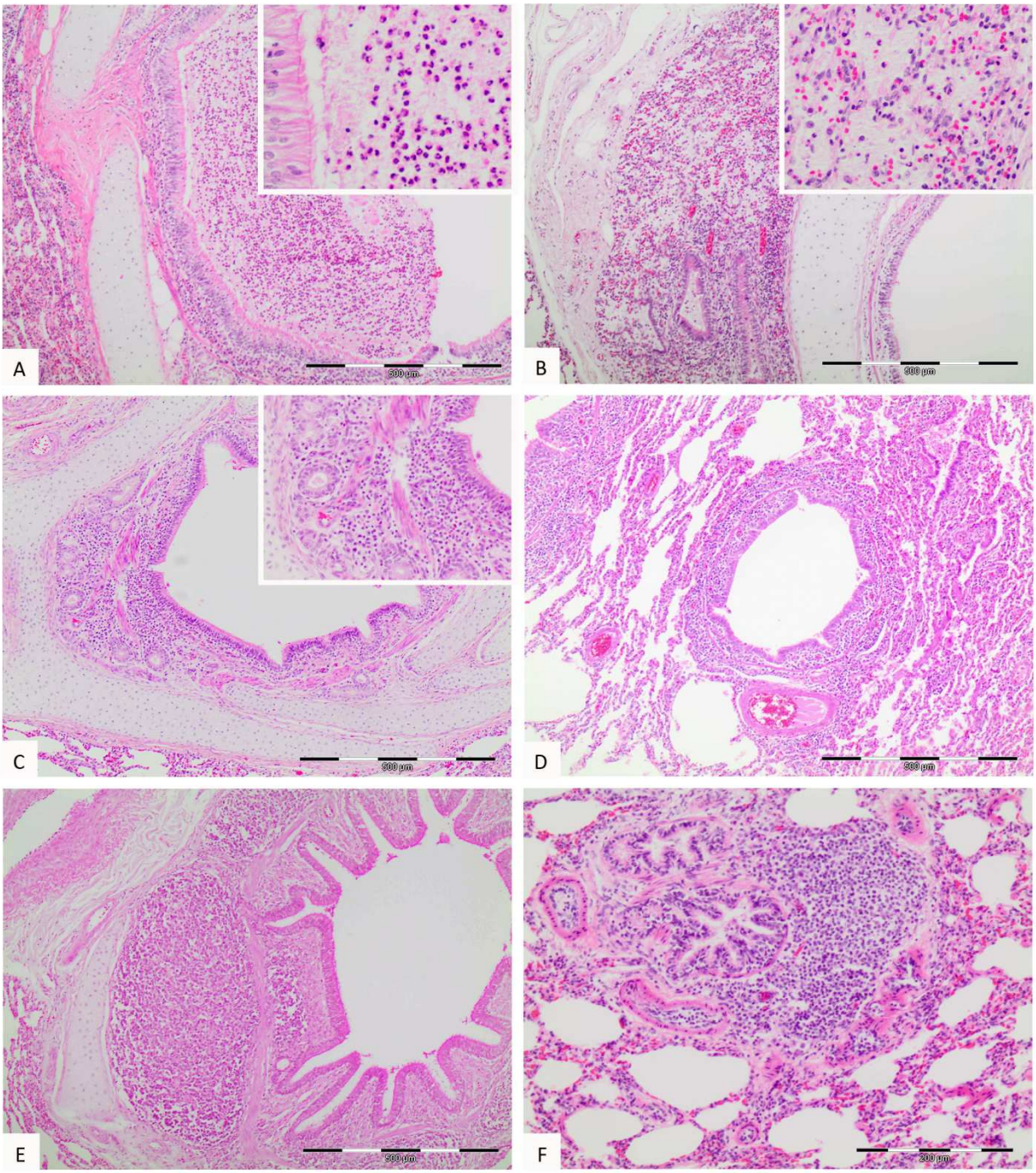


Figura 40: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas observadas en pulmón. A y B. Neumonía broncointersticial. Exudado inflamatorio neutrofílico en vías aéreas (A, CNC3. *10x*), acompañado por mononucleares en luz alveolar e hiperplasia de neumocitos tipo II (B, CNC2. *10x*)**. C-F. Hiperplasia del BALT** leve, afectando a bronquios (C, CNC14. *10x*) y bronquiolos (D, CNC3. *10x*) a moderada, en bronquios (E, CNC19. *20x*) y bronquiolos (F, CNC9. *20x*). (*H&E).*

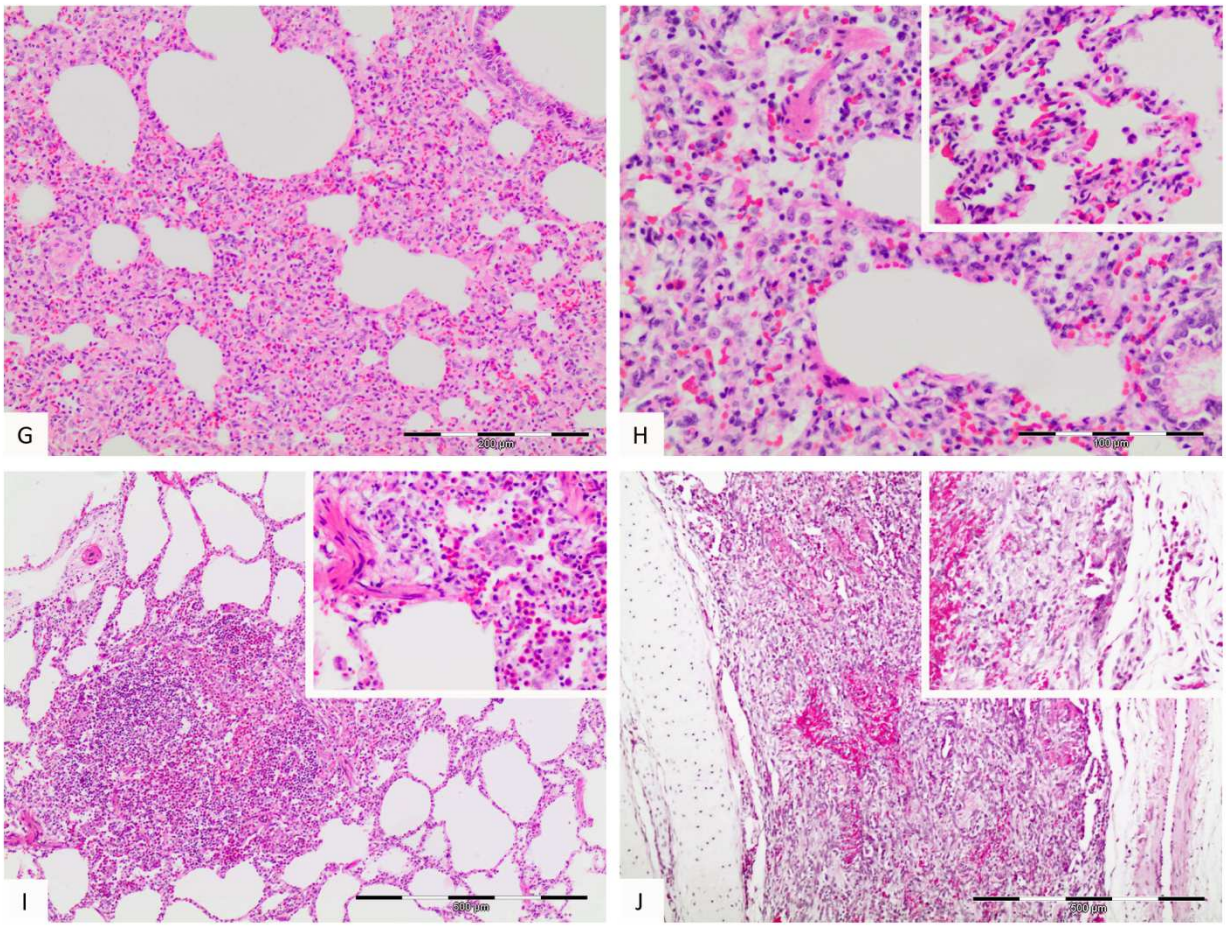


Figura 40 continuación: G. Neumonía intersticial (CNC6. *20x*). **H.** Hiperplasia de neumocitos tipo II en paredes alveolares (CNC9. *40x*). **I y J. Neumonía eosinofílica** focal (I, CNC16. *10x*) con tejido conectivo asociado (J, CNC33. *10x*). ***(H&E).***

Los **lechones** presentaron *neumonía broncointersticial* (60%) de leve (40%) a moderada (20%), *hiperplasia del BALT* (80%) de leve (50%, 5) a moderada (30%, 3), *neumonía intersticial* (80%) de leve (30%, 3) a moderada (50%, 5); con presencia, en algún caso, de células binucleadas o células gigantes multinucleadas en luz alveolar (10%, 1). Otras lesiones observadas fueron *edema* leve (20%, 2), *hemorragia* (40%) de leve (10%, 1) a moderada (30%, 3), *congestión* (50%) de moderada (30%, 3) a severa (20%, 2) y *fibrosis* (20%) de leve (10%, 1) a moderada (10%, 1) en los septos interlobulillares. En los **animales de cebo**, *neumonía broncointersticial* (54%) de leve (7%, 1) a moderada (47%, 7). También presentaron *hiperplasia del BALT* (73%) leve (27%, 4), moderada (33%, 5) o severa (13%, 2), *neumonía intersticial* (60%) de leve (47%, 7) a moderada (13%, 2), con presencia de células binucleadas o células gigantes multinucleadas en luz alveolar (13%, 2). Otras lesiones observadas fueron: *neumonía eosinofílica* focal moderada en el 7% (1) de los animales con tejido conectivo asociado, *edema* leve (33%) a moderado (7%, 1), *hemorragia* (13%, 2), *congestión* leve (13%, 2) a moderada (60%, 9) y *fibrosis* (55%) de leve (20%, 3) a moderada (33%, 5) en los septos interlobulillares y pleura. Las lesiones observadas con mayor frecuencia en pulmón de los **reproductores** fueron: *hiperplasia del BALT* (80%) de leve (60%, 3) a moderada (20%, 1), *neumonía intersticial* (60%) de leve (20%, 1) a moderada (40%, 2), así como *neumonía eosinofílica* focal (20%, 1). Otras lesiones observadas fueron: *edema* moderado (40%, 2), *hemorragia* (80%, 4), *congestión* (100%) de leve (20%, 1) a moderada (80%, 4) y *fibrosis* leve en septos interlobulillares y pleura en el 80% (4) de los animales (Gráfico 5).

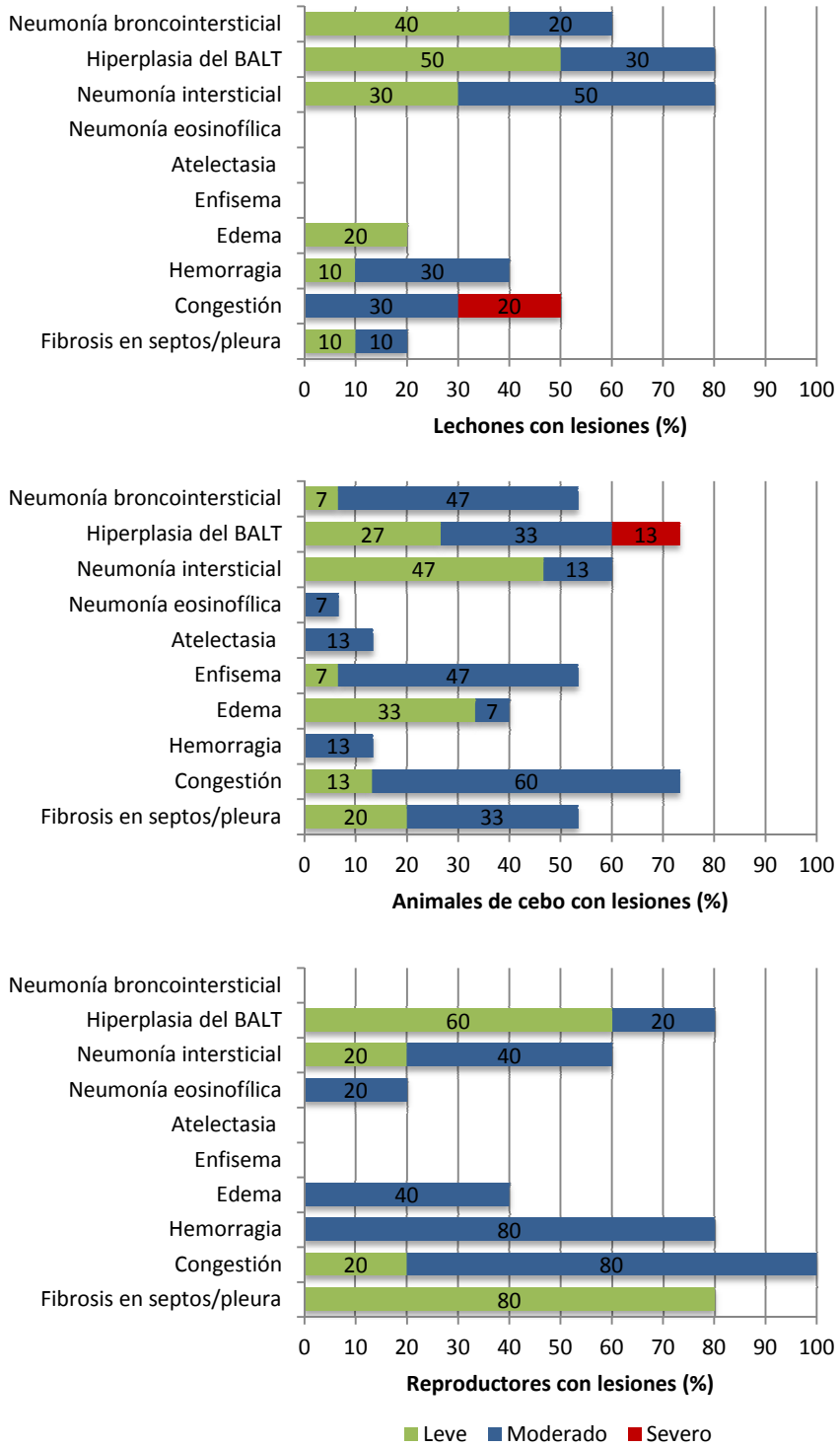


Gráfico 5: Diagnóstico morfológico y severidad de las principales lesiones microscópicas observadas en pulmón. Porcentaje de animales (lechones, animales de cebo y reproductores) con lesiones microscópicas leve, moderada y/o severa. *BALT, tejido linfoide asociado a bronquios/bronquiolos.*

En función de las lesiones microscópicas descritas, se realizó una clasificación de las ***neumonías broncointersticiales*** observadas compatibles con infección por Mh, siguiendo la **clasificación semicuantitativa descrita por Livingston y cols., 1972.**

El 47% (14) de los animales presentó algún grado de neumonía broncointersticial según la clasificación de Livingston (60% (6) de los lechones, 54% (8) de los animales de cebo). Los grados lesionales observados con mayor frecuencia fueron el grado I y II. Los animales con **grado I** (24%, 7) presentaron infiltrado inflamatorio mononuclear linfocítico y/o hiperplasia del BALT en submucosa sin afectar a la capa muscular de bronquios y bronquiolos o a nivel perivascular (Fig. 41, A). Además, se observó leve exudado inflamatorio en la luz bronquial o bronquiolar. En los animales con **grado II** (13%, 4), la capa muscular de la mucosa se vio afectada por el infiltrado inflamatorio o la hiperplasia de BALT, observándose además moderado exudado inflamatorio, principalmente en la luz bronquial o bronquiolar (Fig. 41, B). Estos animales presentaron también leve engrosamiento de las paredes alveolares por la presencia de infiltrado inflamatorio mononuclear (macrófagos y linfocitos). Sólo un 3% (1) de los animales presentaron lesiones de neumonía de **grado III**, donde se observó un moderado a severo exudado inflamatorio mixto compuesto por polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos, y con linfocitos en la luz de bronquios, bronquiolos y alveolos e hiperplasia del BALT (Fig. 41, C). El 7% (2) restante presentó una severa hiperplasia del BALT obstruyendo la luz de las vías aéreas y leve infiltrado inflamatorio mononuclear linfocítico indicativo de neumonía de **grado IV** (Fig. 41, D) (Gráfico 6).

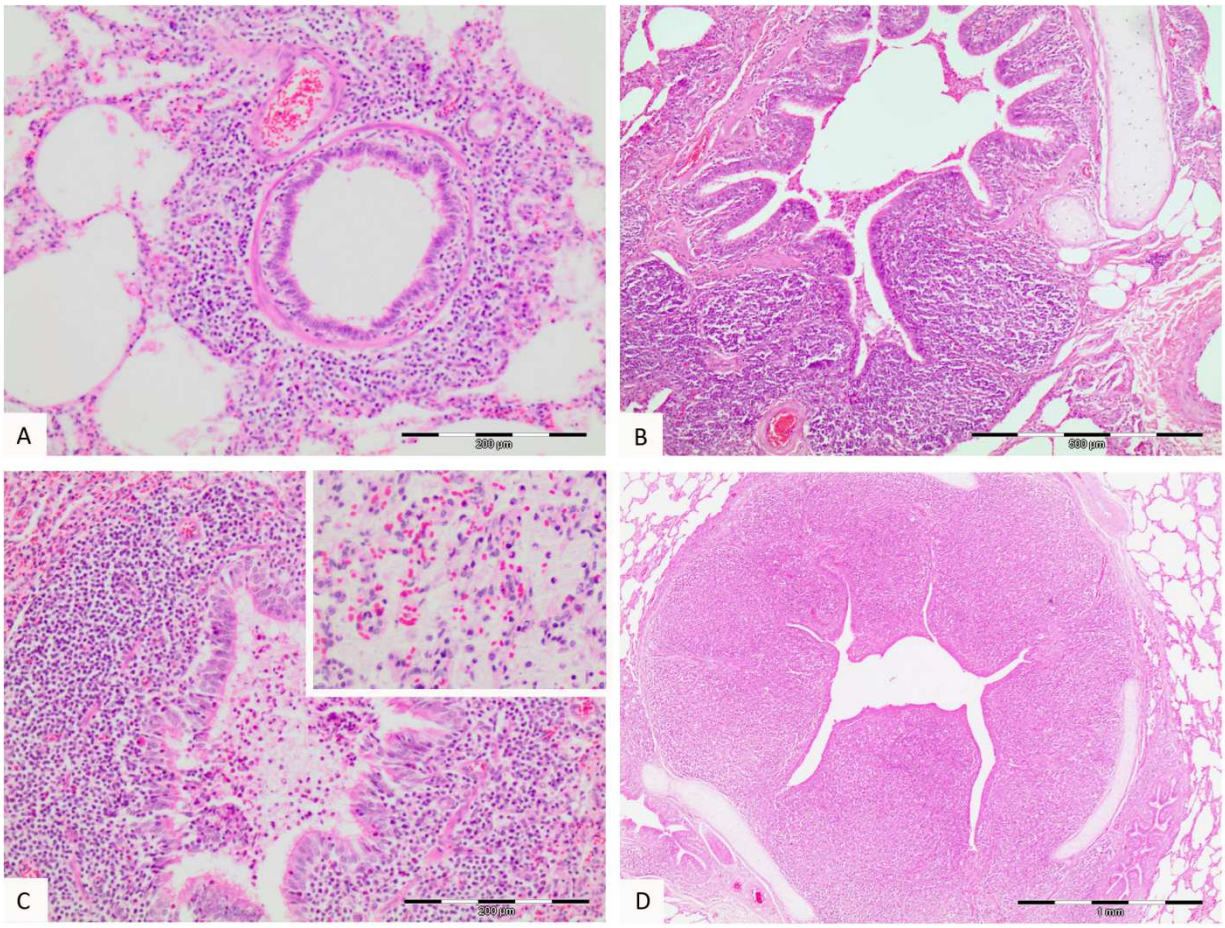


Figura 41: Clasificación semicuantitativa de las neumonías broncointersticiales compatibles con infección por Mh según Livingston y cols., 1972. A. Grado I (CNC2. *20x*). **B.** Grado II (CNC20. *10x*). **C.** Grado III (CNC3. *20x*). **D.** Grado IV (CNC19. *4x*). ***(H&E).***

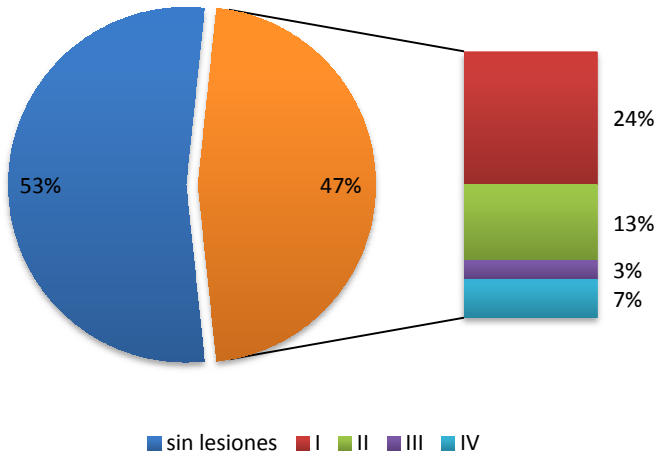


Gráfico 6: Clasificación de neumonías broncointersticiales compatibles con infección por Mh. Clasificación semicuantitativa de las lesiones microscópicas asociadas a inoculación experimental de Mh propuesta por Livingston y cols. en: sin lesiones, y lesiones de neumonía de grado I (I), grado II (II), grado III (III) y grado IV (IV).

Un 40% (4) de los **lechones** estudiados presentó lesiones de neumonía broncointersticial compatible con infección por Mh de grado I y un 20% (2) de grado II. El 40% (4) restante no presentó lesiones. En los **animales de cebo** se observaron lesiones de grado I en un 20% (3), de grado II en un 13% (2), de grado III en un 7% (1) y de grado IV también en un 13% (2) de los animales. El 47% (7) restante no presentó lesiones. Por último, en los animales **reproductores** no se observaron lesiones de neumonía compatible con infección por Mh (Gráfico 7).

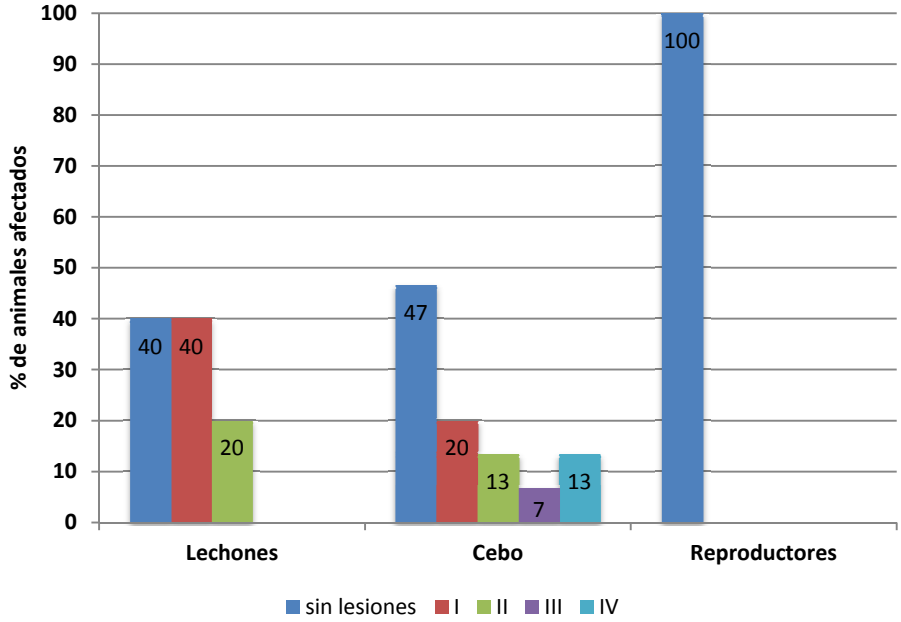


Gráfico 7: Clasificación de neumonías broncointersticiales compatibles con infección por Mh según la edad de los animales. Clasificación semicuantitativa de las lesiones microscópicas asociadas a inoculación experimental de Mh propuesta por Livingston y cols. en: sin lesiones, grado I (I), grado II (II), grado III (III) y grado IV (IV).

Un 67% (20) de los animales inspeccionados presentó ***neumonía intersticial,*** siendo un 27% (8) lechones, un 30% (9) animales de cebo y el 10% (3) restante lechones (Gráfico 8). De estos, un 30% (9) presentó lesiones únicas de *neumonía intersticial.* Éstas se presentaron con distinto grado de severidad, en función del infiltrado inflamatorio, la hiperplasia de neumocitos tipo II en paredes alveolares, así como la presencia de exudado inflamatorio mononuclear de la línea macrófagica con células binucleadas o gigantes multinucleadas en luz alveolar. En ningún caso se presentaron lesiones que indicaran neumonía intersticial aguda, con daño vascular como edema y membranas hialinas en luz alveolar, ni crónicas, con fibrosis en las paredes alveolares.

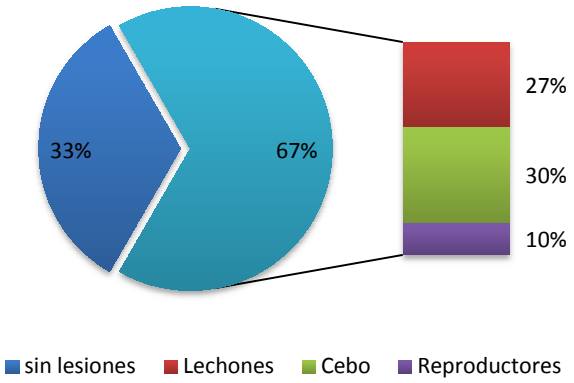


Gráfico 8: Presencia de lesiones microscópicas de neumonía intersticial (única o combinada con bronconeumonía) en los pulmones evaluados. Porcentaje de animales con neumonía intersticial (lechones, animales de cebo y reproductores).

Se observó que un 37% (11) de los animales presentó lesiones combinadas de neumonía broncointersticial compatible con Mh y neumonía intersticial compatible con infecciones víricas; observándose en el 50% de los lechones y un 40% de los animales de cebo inspeccionados.

4.2.2.2 DESCRIPCIÓN Y DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO DE LAS LESIONES MICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN ÓRGANOS HEMOLINFOIDES.

Las lesiones microscópicas observadas en **bazo** fueron: lesiones de tipo vascular *(congestión/hemorragia)* peritrabecular y en pulpa roja (Fig. 42, A y B) y pérdida de celularidad a nivel de folículos linfoides y vainas linfoides periarteriolares *(depleción linfoide)* (Fig. 42, C y D). En **tonsila** se observó un aumento en el número de folículos linfoides y de centros germinativos, por un incremento en el número de células de naturaleza linfoide, tanto a nivel de folículos linfoides como en tejido difuso *(hiperplasia linfoide reactiva)* o infiltrado inflamatorio polimorfonuclear neutrófilos y eosinófilos *(tonsilitis supurativa),* de distribución difusa en el parénquima (Fig. 42, E) y exudado inflamatorio polimorfonucleares neutrofílico con material necrótico en criptas tonsilares (Fig. 42, F). Otras lesiones observadas fueron de tipo vascular *(congestión y/o hemorragia).* En **LNTb** se pudo observar lesiones de tipo vascular *(congestión y/o hemorragia)* (Fig. 43, A), infiltrado inflamatorio polimorfonuclear con neutrófilos y eosinófilos *(linfadenitis supurativa)* (Fig. 43, B), *depleción linfoide* (Fig. 43, C) o *hiperplasia linfoide reactiva* (Fig. 43, D).

Del total de animales inspeccionados (20), se observó en bazo, depleción linfoide en un 60% (12) de los casos y hemorragias y congestión en un 5% (1) y 20% (4) respectivamente. En tonsila (20), se observó hiperplasia linfoide reactiva en un 65% (13) y tonsilitis supurativa en un 65% (13) de los animales. En LNTb (30) se observó linfadenitis supurativa en un 20% (6), depleción linfoide en un 10% (3), hiperplasia linfoide reactiva en un 20% (6), y hemorragia y congestión en un 10% (3) de los animales.

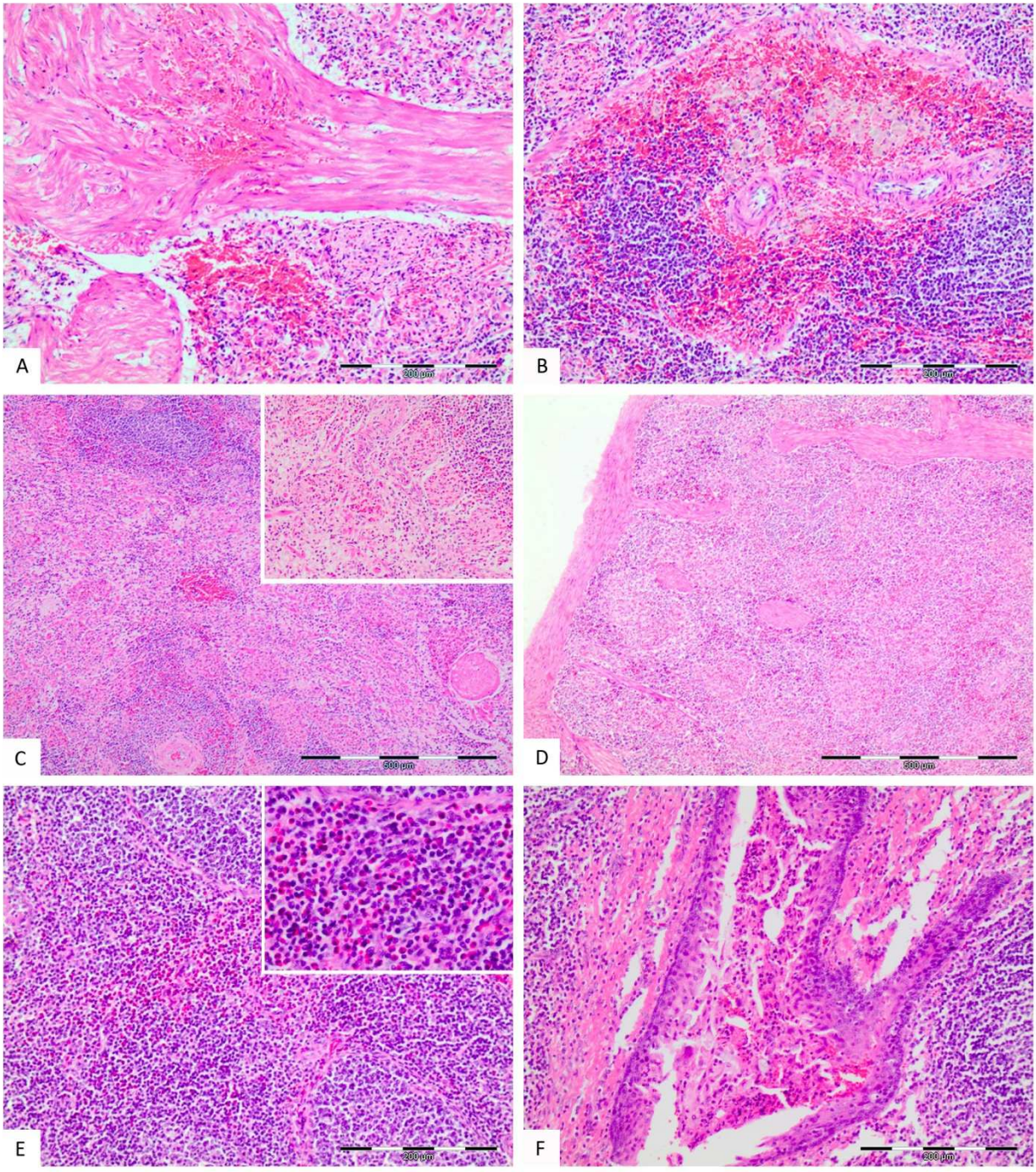


Figura 42: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas observadas en bazo (A-D) y tonsila (E y F). A y B. Hemorragia en trabéculas esplénicas (A, CNC2. *20x*) y pulpa roja (B, CNC2. *20x*). **C y D.** Depleción linfoide (C, CNC17 y D, CNC23. *10x*). **E.** Tonsilitis supurativa (CNC25). **F.** Tonsilitis supurativa (Exudado y material necrótico en criptas tonsilares) (CNC1). ***(H&E)***.

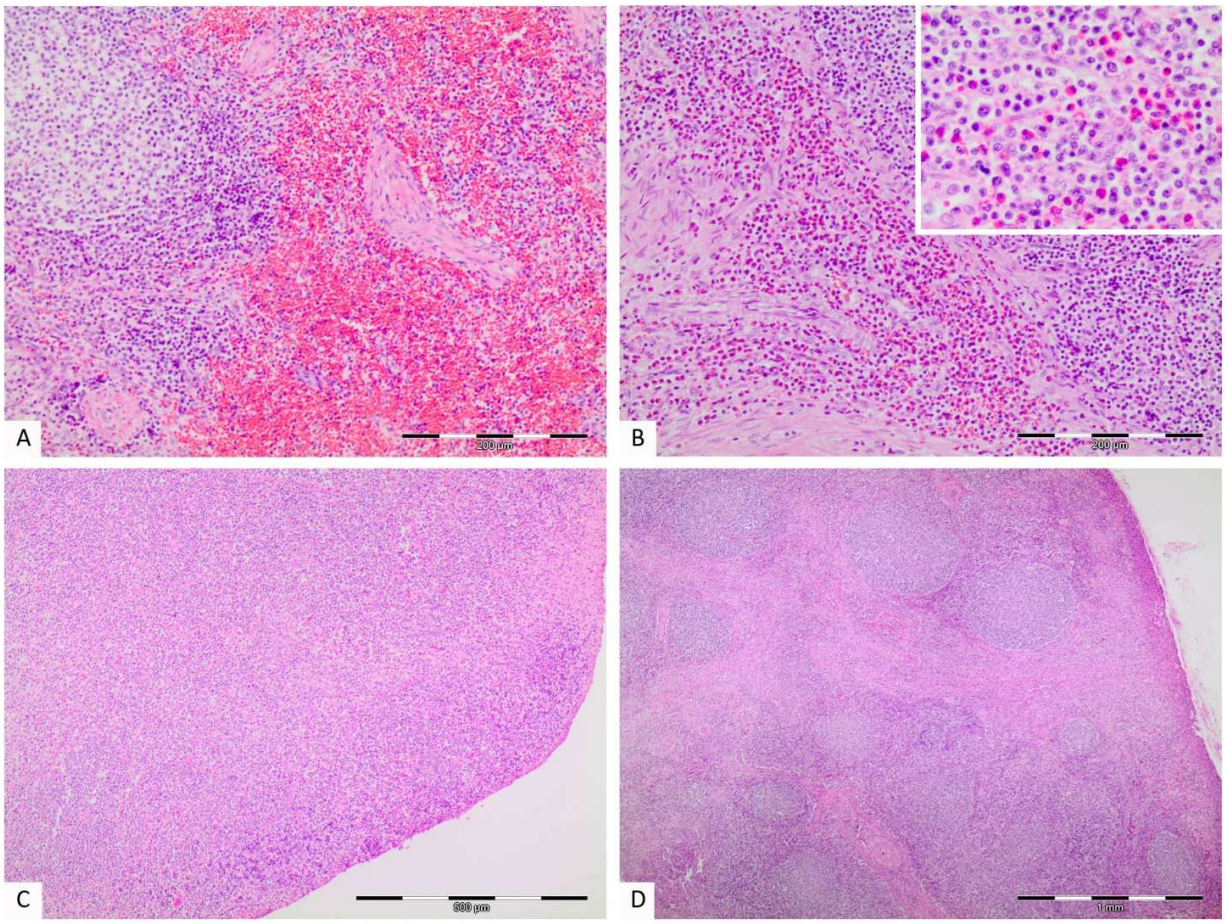


Figura 43: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas observadas en LNsTb. A. Congestión y hemorragia (CNC9). **B.** Linfadenitis supurativa (CNC11). **C.** Depleción linfoide (CNC7). **D.** Hiperplasia linfoide reactiva (CNC23). *(H&E; D 4x; C 10x; A y B 20x).*

En **lechones**, las lesiones observadas con mayor frecuencia en **LNTb** fueron: *depleción linfoide* (30%) de leve (20%, 2) a moderada (10%, 1), *hemorragia* (30%) de leve (10%, 1) a severa (20%, 2), *congestión* (20%) leve (10%, 1) a severa (10%, 1). Además, se observó *hiperplasia linfoide reactiva* (10%, 1) leve y *linfadenitis supurativa* (10%, 1) severa (Gráfico 9).

En los **animales de cebo**, se observó *depleción linfoide* (47%) de leve (27%, 4) a moderada (20%, 3), *congestión* (20%) de leve (7%, 1) a moderada (13, 2) y *hemorragia* (7%, 1) leve en **bazo**. En **tonsila**, las principales lesiones fueron *hiperplasia linfoide reactiva* (87%) de leve (60%, 9) a moderada (27%, 4); *tonsilitis supurativa* (53%) de leve (13%, 2) a moderada (40%, 6). En **LNTb**, se observó, con mayor frecuencia, *hiperplasia linfoide reactiva* (34%) leve (27%, 4) a moderada (7%, 1), seguida de *linfadenitis supurativa* (27%) leve (7%, 1) a moderada (20%, 3) y *congestión* (7%, 1) leve (Gráfico 9).

En los **reproductores**, se observó *depleción linfoide* moderada (100%, 5) y *congestión* (20%, 1) moderada en **bazo**. En **tonsila**, se observó *tonsilitis supurativa* (100%, 5) de leve (40%, 2) a moderada (60%, 3). Y en **LNTb** la única lesión observada fue *linfadenitis supurativa* en el 40% (2) de los animales (Gráfico 9).

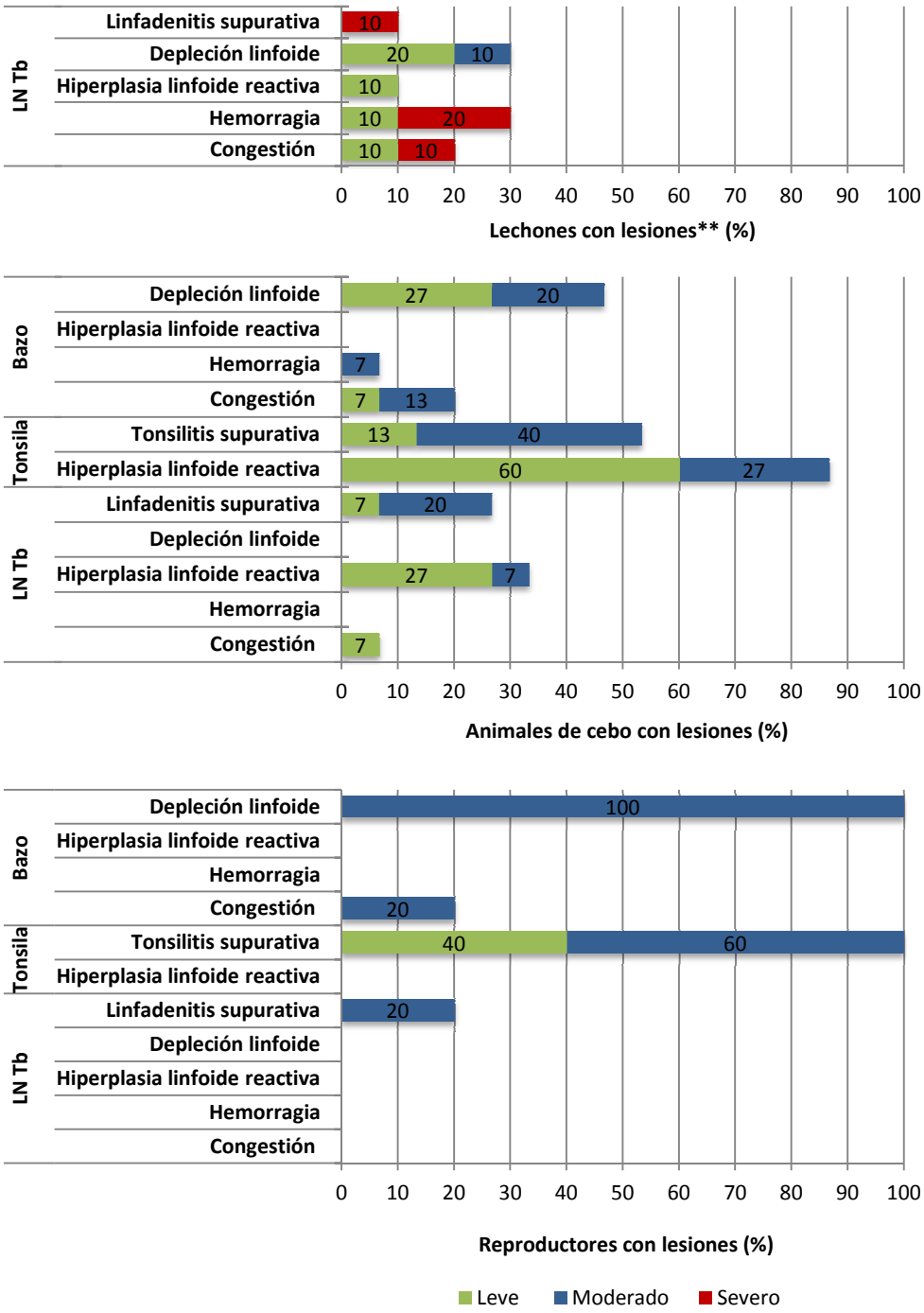


Gráfico 9: Diagnóstico morfológico y severidad de las principales lesiones microscópicas observadas en órganos hemolinfoides. Porcentaje de animales (lechones, animales de cebo y reproductores) con lesiones microscópicas leve, moderada y/o severa. ** En lechones sólo se evaluó el LNTb.

4.2.2.3 DESCRIPCIÓN Y DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO DE LAS LESIONES MICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN RIÑÓN E HÍGADO.

Las lesiones microscópicas observadas en **riñón**, fueron infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear linfocítico/linfoplasmocitario a nivel intersticial en corteza, médula y/o pelvis renal *(nefritis intersticial)* (Fig. 44, A), con organización del infiltrado formando folículos linfoides bien demarcado a nivel intersticial *(nefritis intersticial con patrón folicular)* (Fig. 44, B), infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear neutrófilos en la luz de los túbulos renales *(tubulonefritis supurativa)* (Fig. 44, C y D). Otros animales presentaron proliferación de tejido conectivo intersticial con focos de infiltrado inflamatorio mononuclear *(nefritis intersticial crónica)* y cambios vasculares *(congestión)*. Así, del total de los animales, se observó la presencia de nefritis intersticial en el 63% (19) de los animales inspeccionados, nefritis folicular en un 7% (2), tubulonefritis supurativa en un 3% (1), fibrosis renal en otro 3% (1) y finalmente congestión en el 27% (3) de los animales inspeccionados.

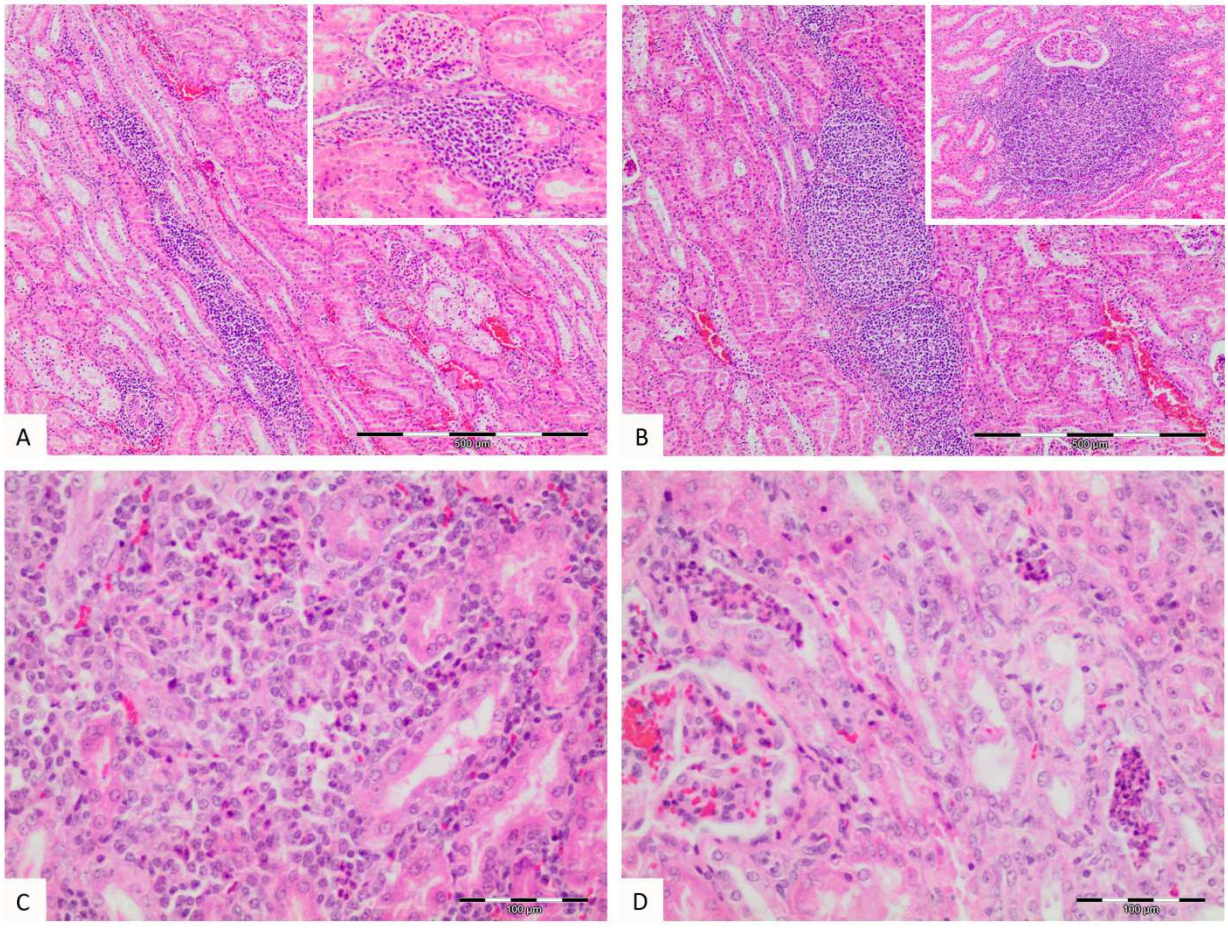


Figura 44: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas observadas en riñón. A. Nefritis intersticial (CNC2) *(10x). Inset, a nivel yuxtaglomerular (CNC 25).* **B. Nefritis intersticial con patrón folicular** (CNC2) *(10x). Inset, a nivel yuxtaglomerular (CNC4).* **C y D. Tubulonefritis supurativa** (CNC24). ***(H&E).***

En los **lechones**, la única lesión observada fue *nefritis intersticial* moderada, afectando al 50% (5). En los **animales de cebo**, se observó *nefritis intersticial* moderada en un 53% (8) de los animales. *nefritis intersticial con patrón folicular* moderada en un 13% (2) de los animales y *nefritis intersticial crónica* en un 7% (1). Otras lesiones fueron: *tubulonefritis supurativa* leve en otro 7% (1) y congestión leve (27%, 4) a moderada (13%, 2). En los **reproductores,** se observó *nefritis intersticial* leve (40%, 6), así como *congestión* moderada en el 40% (6) de los animales inspeccionados (Gráfico 10).

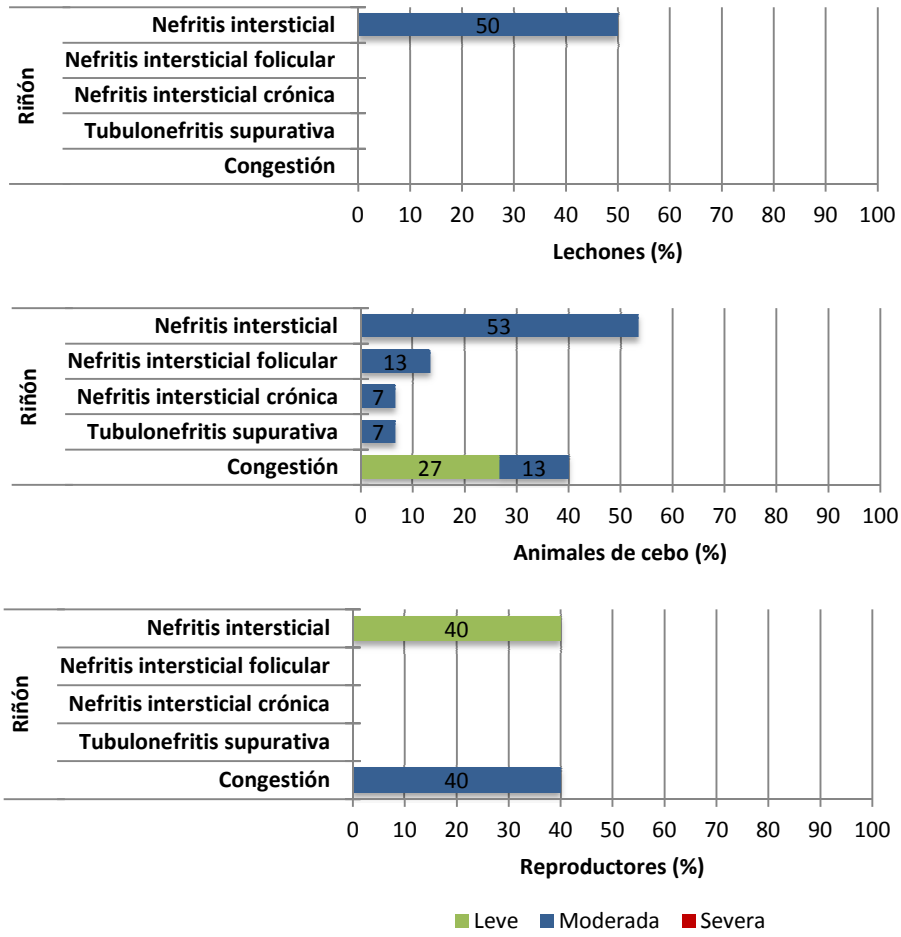


Gráfico 10: Diagnóstico morfológico y severidad de las principales lesiones microscópicas observadas en riñón. Porcentaje de animales (lechones, animales de cebo y reproductores) con lesiones microscópicas leve, moderada y/o severa.

Las lesiones microscópicas observadas con mayor frecuencia en **hígado** fueron: infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear linfocítico/linfoplasmocitario en septos interlobulillares, espacios porta y/o sinusoides hepáticos *(hepatitis linfocítica)* (Fig. 45, A), infiltrado inflamatorio polimorfonuclear eosinofílico localizado a nivel de septos interlobulillares, espacios porta y/o sinusoides hepáticos *(hepatitis eosinofílica)* (Fig. 45, B). Estas lesiones, en algunos casos, estaban acompañadas por proliferación de tejido conectivo en septos interlobulillares y espacios porta *(hepatitis fibrosa eosinofílica)* (Fig. 45, C y D) y por infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario organizado, formando folículos linfoides, rodeado por polimorfonucleares y tejido conectivo conformando un patrón folicular (Fig. 45, E). Otras lesiones fueron necrosis hepática multifocal con infiltrado inflamatorio de tipo mononuclear linfohistiocítico rodeado por tejido conectivo *(hepatitis necrótica)* (Fig. 45, F), cambios degenerativos y/o vasculares *(degeneración hepática y congestión).*

Así, del total de los animales evaluados, se observó la presencia de hepatitis linfocítica en un 77% (23) de los casos, hepatitis eosinofílica en un 33% (10), hepatitis eosinofílica fibrosa en un 43% (13), con patrón folicular en el 23% (7), hepatitis necrótica en un 3% (1) de los animales y degeneración hepática y/o congestión en un 40% (12) y 30% (9), respectivamente.

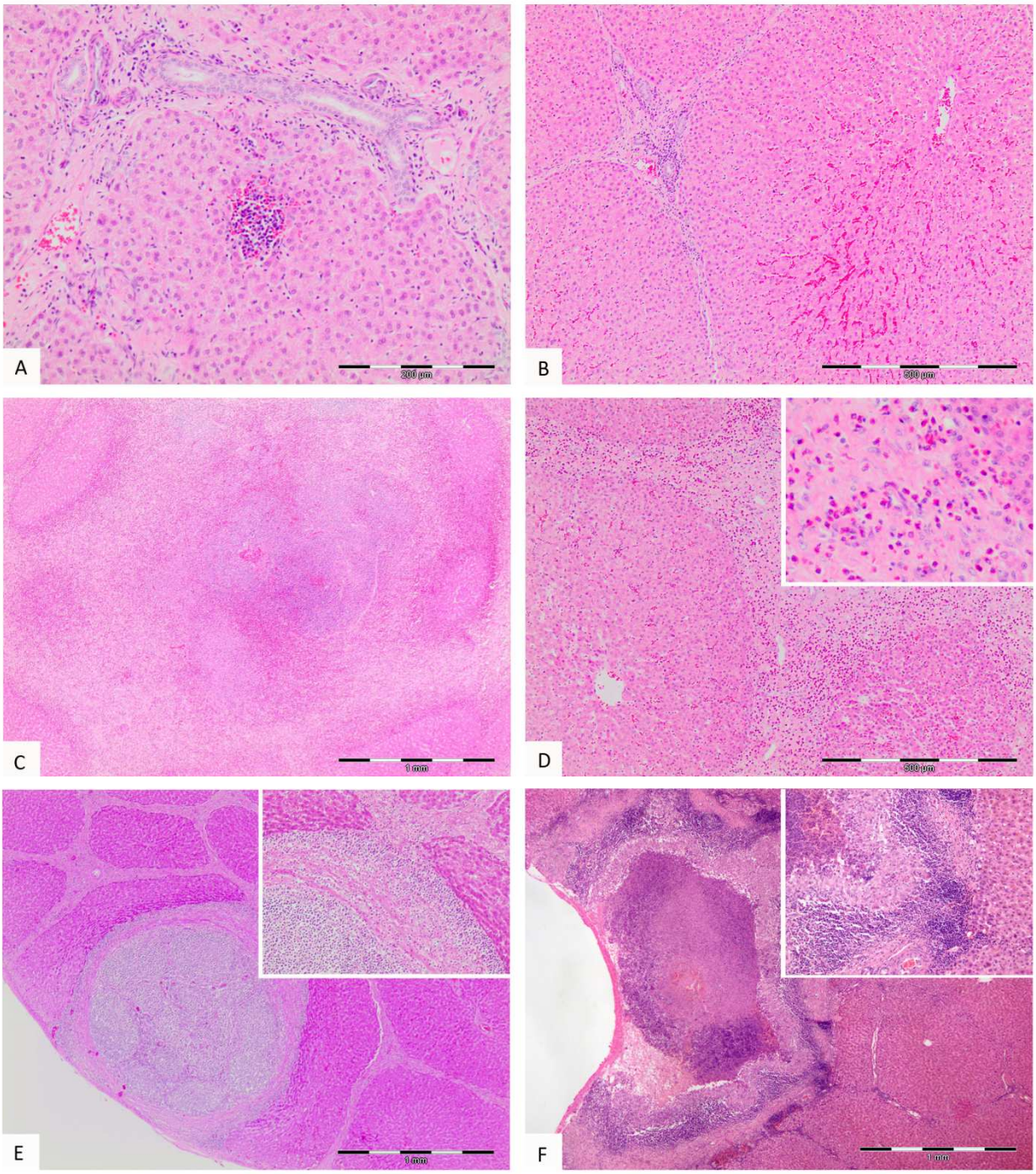


Figura 45: Diagnóstico morfológico de las lesiones microscópicas observadas en hígado. A. Hepatitis linfocítica (CNC19) *(20x)*. **B.** Congestión en sinusoides hepáticos y vena centrolobulillar (CNC19) *(10x)*. **C y D. Hepatitis fibrosa eosinofílica** en septos interlobulillares (CNC13) *(C 4x; D 10x)*. **E. Patrón folicular asociado** a proceso de hepatitis fibrosa eosinofílica (CNC3) *(4x)*. **F. Hepatitis necrótica subcapsular** (CNC27) *(4x)*. ***(H&E).***

En **lechones**, la lesión observada con mayor frecuencia fue la *hepatitis linfocítica* multifocal leve (30%, 3) a moderada (50%, 5). Además, se observó *hepatitis eosinofílica* de moderada (10%, 1) a severa (10%, 1), y *hepatitis fibrosa eosinofílica* leve (10% 1), moderada (20%, 2) y severa (10%, 1) en algunos casos con patrón folicular rodeado de tejido conectivo asociado a procesos de hepatitis fibrosa (10%, 1). Otras lesiones fueron *degeneración hepática* leve (40%, 4) y *congestión* moderada (10%, 1) (Gráfico 11).

En **animales de cebo**, se observó *hepatitis linfocítica* leve (27%, 4) a moderada (40%, 6) en un 67% de los animales. Además se observó leve (13%, 2) a moderada (27%, 4) *hepatitis eosinofílica* en un 40% de los animales y *hepatitis fibrosa eosinofílica* leve (7%, 1), moderada (40%, 6) o severa (13%, 2). En el 40% de los animales se observó patrón folicular de moderado (20%, 3) a severo (20%, 3) asociado a procesos de hepatitis fibrosa eosinofílica. Otras lesiones fueron *degeneración hepática* (47%, 7) y *congestión* leve (7%, 1) a moderada (33%, 5) (Gráfico 11).

Los **reproductores** presentaron leve (80%, 4) a moderada (20, 1) *hepatitis linfocítica*. Además, se observó leve (20%, 1) a moderada (20%, 1) *hepatitis eosinofílica* en un 40% de los animales. Otras lesiones fueron *hepatitis necrótica* multifocal en un 20% (1) de los animales, degeneración hepática microvacuolar (20%, 1) y congestión leve (40%, 2) a moderada (20%, 1) (Gráfico 11).

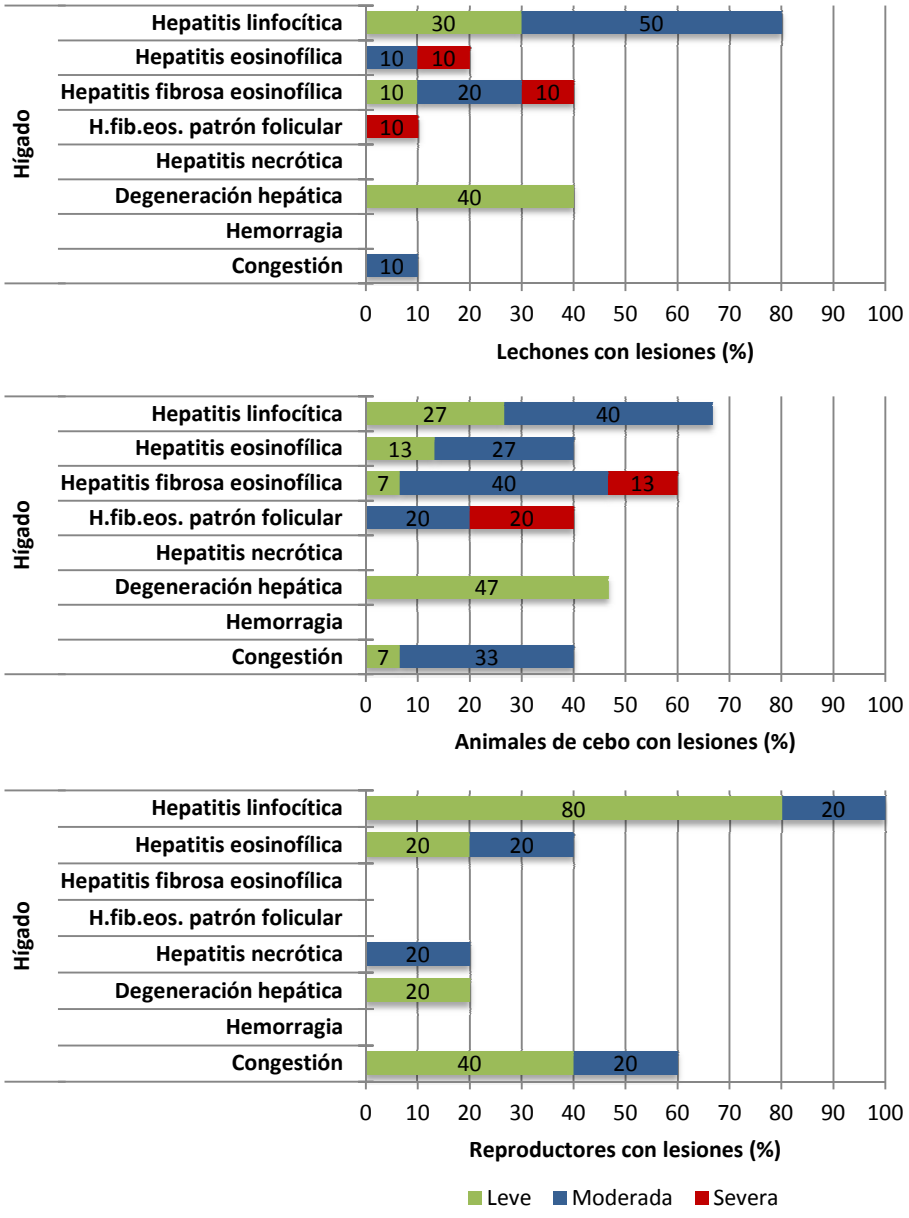


Gráfico 11: Diagnóstico morfológico y severidad de las principales lesiones microscópicas observadas en hígado. Porcentaje de animales (lechones, animales de cebo y reproductores) con lesiones microscópicas leve, moderada y/o severa.

4.2.3 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Se realizó estudio inmunohistoquímico para la detección de Ags de Mh en pulmón y PRRSv y PCV2 en pulmón, órganos hemolinfoides, hígado y riñón. Se observó inmunorreacción frente a Mh en el 50% (15) de los animales evaluados y frente a PCV2 en el 13% (4). No se observó inmunorreacción frente a PRRSv.

4.2.3.1 DETECCIÓN DE MH

En la IHQ realizada frente a Ags de Mh, se observó inmunorreacción granular en la superficie del epitelio respiratorio de bronquios y bronquiolos (Fig. 46) en el 60% (6) de los lechones, el 47% (7) de los animales de cebo y en el 40% (2) de los reproductores.

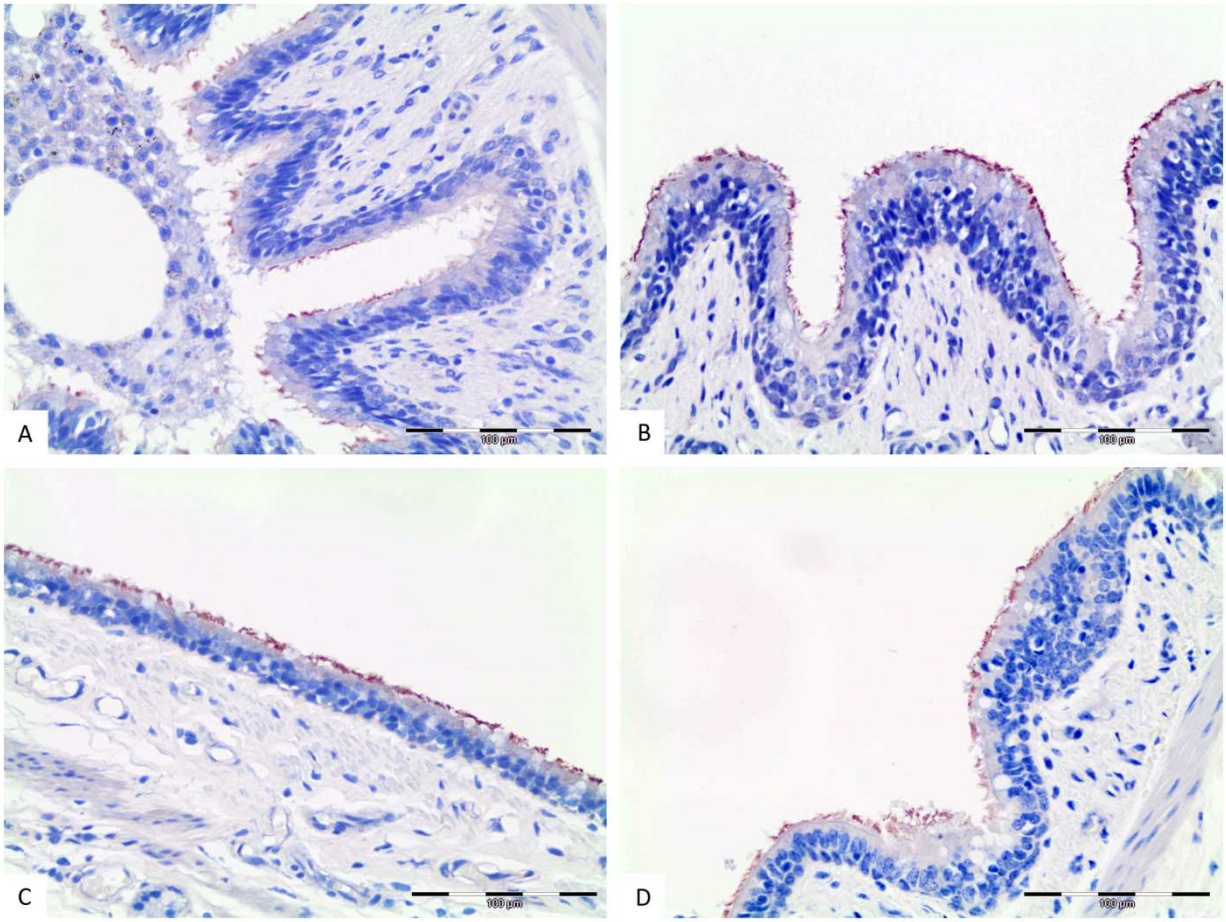


Figura 46: **Inmunohistoquímica frente a Mh.** Inmunorreacción granular frente a Mh en la superficie del epitelio respiratorio (A y B, CNC22; C, CNC28; D, CNC29). ***(Método SBP, AEC; A-D 40x)***.

Detección de Mh según la clasificación semicuantitativa de neumonía broncointersticial.

En función de los grados de neumonía broncointersticial compatibles con infección por Mh, se detectó inmunorreacción frente a este patógeno en un 57% (8) de los animales que presentaban algún grado lesional (14). Se detectó Mh en el 86% (6) de los animales que presentaban grado I (7); en el 25% (1) de los que presentaban lesiones de grado II (4), en el 100% (1) de los que presentaban lesiones de grado III (1) y en ningún caso se detectó Mh en animales con lesiones de grado IV.

Además, un 44% (7) de los animales que no presentaban lesiones de neumonía broncointersticial (16) también presentaron inmunorreacción frente a Mh. En este caso, el 71% (5) presentaba neumonía intersticial y el 29% (2) restante eran pulmones sanos.

Así, se observó inmunorreacción granular en el epitelio respiratorio en un 75% (3) de los **lechones** que no presentaban lesiones y de los que presentaban lesiones de *grado I*. Los lechones que presentaron lesiones de *grado II* no mostraron inmunorreacción. En el caso de los **animales de cebo**, se observó inmunorreacción granular frente a Ags de Mh en un 29% (2) de los animales que no presentaban lesiones de neumonía broncointersticial, en el 100% (3) de los que presentaban lesiones de *grado I,* en el 50% (1) de los que presentaban *grado II* y el 100% (1) de los animales con *grado III*. Los animales con lesiones de *grado IV* fueron inmunohistoquímicamente negativos. Por último, en los **reproductores** a pesar de no presentarse ningún grado de neumonía broncointersticial, fue posible detectar inmunorreacción granular en el 40% (2) de los animales (Gráfico 12).

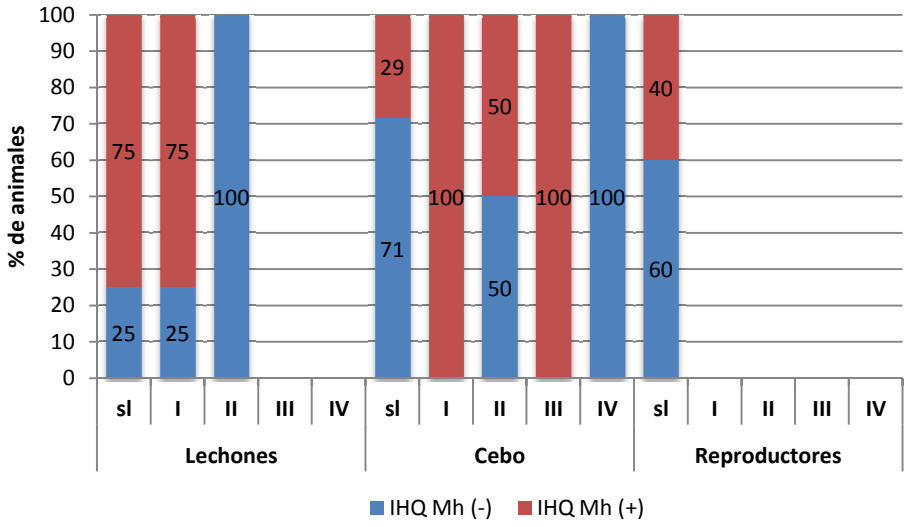


Gráfico 12: Detección de Ags de Mh en lechones, animales de cebo y reproductores, según el grado de neumonía broncointersticial compatible con infección por Mh. Presencia (IHQ Mh +) **o ausencia (IHQ Mh -) de** Inmunorreacción granular sobre los cilios del epitelio respiratorio.

4.2.3.2 DETECCIÓN DE PRRSV

No se detectó Ags de PRRSv en ningún órgano estudiado de ninguna de las categorías.

4.2.3.3 DETECCIÓN DE PCV2

Por otro lado, fue posible observar la presencia de inmunorreacción intracitoplasmática frente a Ags de PCV2 en células epiteliales de los túbulos renales en un 7% (2) de los animales totales y en células de la línea monocito/macrofágica en LNsTb de otro 7% (2) (Fig. 47). No se detectó Ags de PCV2 en el pulmón, resto de órganos hemolinfoides e hígado. Sólo fue posible su detección en un 30% (3) de los lechones y en un 7% (1) de los animales de cebo.

Así, en **lechones**, se observó en el epitelio de los túbulos renales en un 10% de los animales y en células de la línea monocito/macrofágica (histiocitos) y células dendríticas de LNs Tb (Fig. 47, B) en un 20%. En un 7% de los **animales de cebo** se observó inmunorreacción intracitoplasmática en epitelio de túbulos renales (Fig. 47, A).

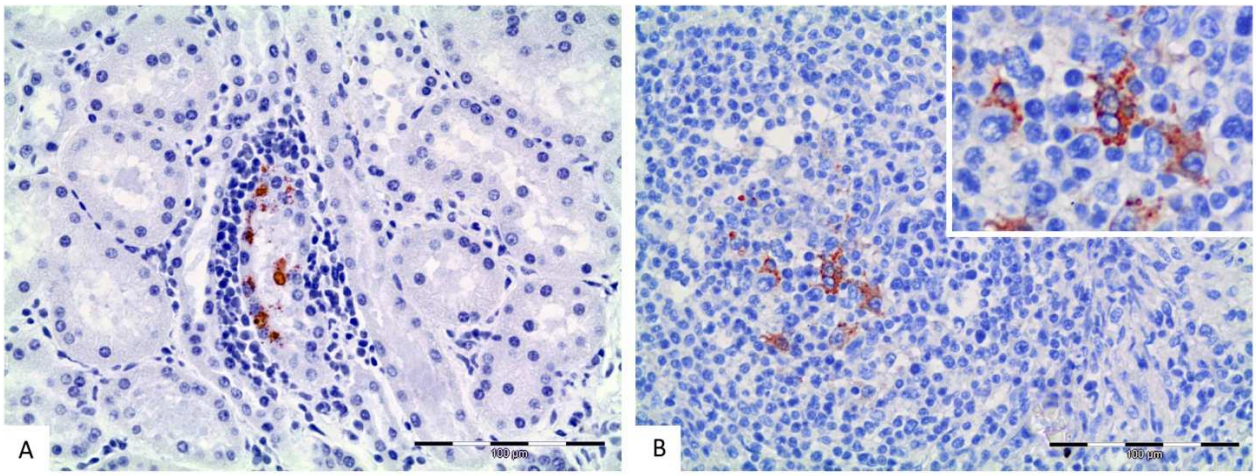


Figura 47: Inmunohistoquímica frente a PCV2. A. Riñón. Inmunorreación granular intracitoplasmática en células del epitelio tubular (CNC2). **B. LNTb.** Células de la línea macrofágica y células dendríticas (CNC6). ***(Método SBP, AEC; A y B 40x).***

4.3 ESTUDIO 3: ESTUDIO DE PREVALENCIA DE MH, PRRSV Y PCV2 EN LA POBLACIÓN DE CNC

4.3.1 SEROPREVALENCIA DE MH, PRRSV Y PCV2 EN EL ARCHIPIÉLAGO CANARIO

Se realizó serología transversal para la detección de inmunidad frente a Mh, PRRSv y PCV2 en un total de 329 ejemplares pertenecientes a 35 explotaciones distribuidas por el archipiélago. En Gran Canaria se analizó un total de 228 ejemplares de distintas edades (10 explotaciones), 42 ejemplares adultos en Lanzarote (8 explotaciones), 41 en Tenerife (11 explotaciones) y 18 en La Palma (6 explotaciones). En estos animales no se realizaba programa de vacunación frente a Mh, PRRVs ni PCV2, de manera que en la interpretación de los resultados, los Acs detectados son atribuibles a inmunidad pasiva, contacto y/o infección, inducida por los agentes infecciosos evaluados.

En el total de animales estudiados, un 57% (187) de los animales presentaron inmunidad frente a PCV2, observándose Acs de tipo IgG (57%, 187) y Acs de tipo IgM (5%, 17), indicando estos últimos, infección reciente. En menor medida, un 11% (37) de los animales presentó inmunidad frente a Mh y solamente un 4% (13) presentaba Acs frente a PRRSv (Gráfico 13).

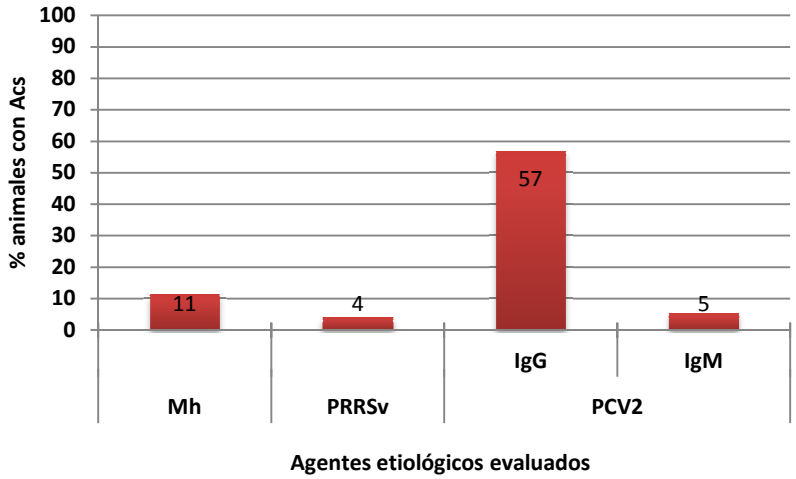


Gráfico 13: Seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 en el archipiélago canario. Porcentaje de animales con títulos de anticuerpos (Acs) frente a Mh, PRRSv y PCV2 (IgG/IgM) en el total de animales evaluados.

De las 35 explotaciones analizadas en el archipiélago, fue posible observar coinfección entre los distintos agentes etiológicos evaluados en un 51% (18). Se observó coinfección entre Mh y alguno de los agentes víricos en el 48% (17) de las explotaciones. Así, un 20% (7) presentaba Acs frente a Mh y PCV2, un 25% (9) frente a Mh, PRRSv y PCV2 y un 3% (1) frente a Mh y PRRSv. El 3% (1) restante presentaba coinfección entre los agentes víricos evaluados (PRRSv y PCV2), sin haber tenido contacto con Mh. En un 43% (15) de las explotación se evidenció contacto con un único agente etiológico. Un 3% (1) sólo presentó títulos de Acs frente a Mh y un 40% (14), sólo frente a PCV2. No se observó infección única por PRRSv. Únicamente un 6% (2) de las explotaciones se encontraba libre de estos agentes etiológicos (Gráfico 14).

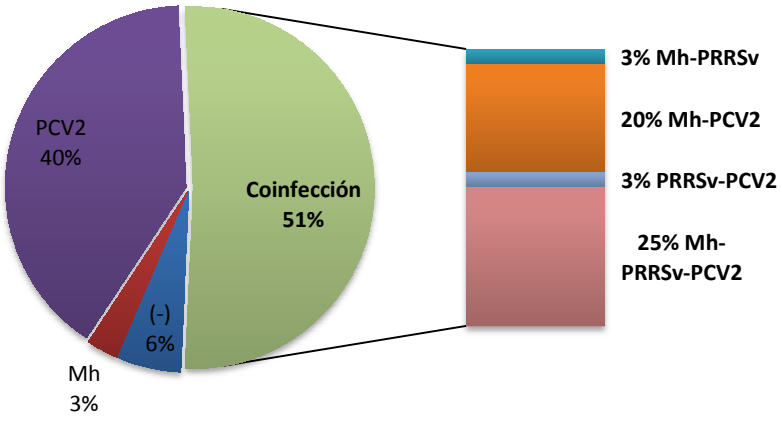


Gráfico 14: Detección de coinfección entre Mh, PRRSv y PCV2 en las explotaciones del Archipiélago Canario. Porcentaje de explotaciones en las que se detectó inmunidad frente a varios agentes etiológicos.

4.3.1.1 SEROPREVALENCIA DE MH, PRRSV Y PCV2 EN GRAN CANARIA

El 69% (228) de los animales analizados, pertenecían a 10 explotaciones de CNC ubicadas en la isla de Gran Canaria. En estos animales se evaluó la prevalencia de los distintos agentes patógenos (bacteriano y víricos) desarrollando dos tipos de estudios serológicos. Se realizó un seroperfil transversal en los 228 animales seleccionados. Posteriormente, se llevó a cabo una serología longitudinal en 5 de las 10 explotaciones (50%), evaluando 31 de los 93 ejemplares reproductores (33%) analizados en la serología trasversal.

- ✓ ***SEROLOGÍA TRANSVERSAL***

Los 228 animales analizados se dividieron en reproductores (92 animales), lechones (82 animales) y animales de cebo (54 animales).

Las técnicas de ELISA realizadas fueron validadas siguiendo el protocolo recomendado por el laboratorio, resultando positivas para Mh aquellas muestras cuya DO a 450nm fue igual o inferior al PC (+), negativas aquellas cuya DO fue igual o superior al PC (-) y dudosas aquellas que se encontraron entre ambos valores. En el caso de los ELISAs realizados para PRRSv y PCV2, las técnicas también fueron validadas según las indicaciones del laboratorio, resultando positivas aquellas muestras cuya DO fue igual o superior al PC y negativas aquellas que presentaban valores inferiores. El PC+ y PC- para Mh y el PC para PRRSv y PCV2 obtenidos para cada ensayo se especifican en el *Anexos-Tabla 20*, así como las DOs de cada muestra para los 3 ELISAs realizados.

Del total de 228 animales, el 18% presentó Acs frente a Mh (40), el 1% frente a PRRSv (3) y frente a PCV2 un 56 % (125), de los que un 54% presentó Acs de tipo IgG (123) y un 6% Acs de tipo IgM (13) (Gráfico 15Gráfico 15). Aquellos animales en los que se detectaron títulos de Acs IgM mayores de 1/100, al comparar las DO para IgG e IgM (*Anexos-Tabla 20*), se observó que el 54% (7) presentaba infección activa (DO para IgM>DO para IgG) y el 46% restante (6) presentaba infección reciente, de uno o dos meses de antigüedad (DO para IgG>DO para IgM, siendo IgM>1/100).

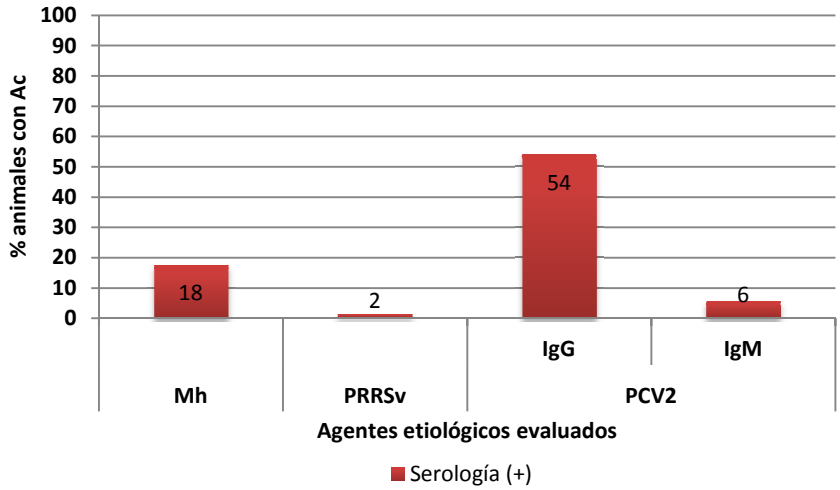


Gráfico 15: Seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 en Gran Canaria. Porcentaje de animales con inmunidad (Serología +) frente a los agentes etiológicos evaluados en la serología transversal.

Al estudiar el porcentaje de animales con títulos de Acs en función de las distintas categorías (82 lechones, 54 animales de cebo, 92 reproductores), se observó presencia de Acs frente a Mh en un 9% de los lechones (7), un 11% de los animales de cebo (6) y en un 30% de los reproductores (28) y frente a PRRSv solo en 3% de los reproductores (3). En el caso de PCV2 se observó un 72% de animales de cebo (39) y un 71% de reproductores (65), seguido de un 20% de lechones (16) con Acs de tipo IgG. Los Acs de tipo IgM se detectaron en muy bajo porcentaje en todas las categorías (12% (10) lechones; 4% (2) animales de cebo y 1% (1) reproductor) (Gráfico 16).

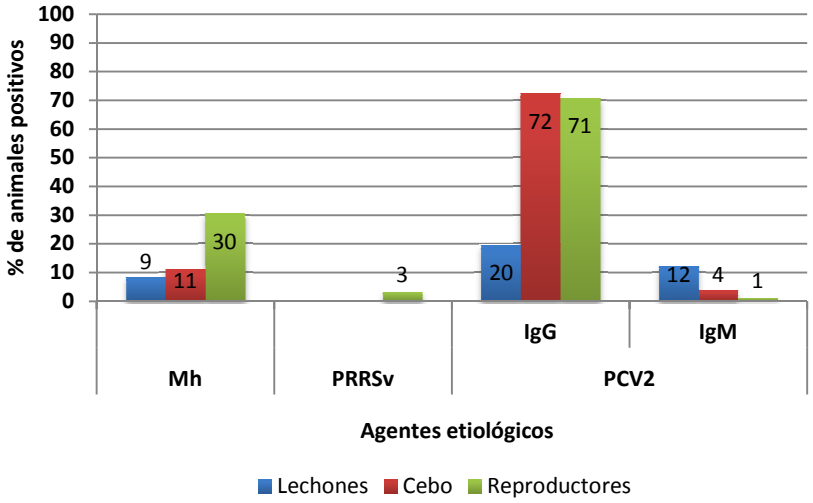


Gráfico 16: Seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 en Gran Canaria por categorías. Porcentaje de lechones, animales de cebo y reproductores con inmunidad (positivos) frente a los agentes etiológicos evaluados en la serología transversal.

Al comparar los valores de DO de IgG e IgM de los animales con títulos de Acs>1/100 para IgM (*Anexos-Tabla 20*), se observó la presencia de infección activa en el 9% de los lechones analizados e infección reciente en un 4% de los lechones, 4% de los animales de cebo y un 1% de los reproductores analizados.

Al analizar las coinfecciones entre los distintos agentes etiológicos en las explotaciones evaluadas en Gran Canaria (10), se observó que un 70% (7) presentaba Ac frente a varios de estos agentes. Se observó la presencia de coinfección entre Mh y uno o los dos agentes víricos estudiados, así un 40% (4) de las explotaciones presentaron coinfección entre Mh y PCV2 y el 30% (3) restante entre Mh, PRRSv y PCV2. Un 20% (2) de las explotaciones presentó Acs frente a un único agente etiológico (PCV2). Finalmente, se observó que un 10% (1) de las explotaciones no presentó Acs frente a ningún agente (Gráfico 17).

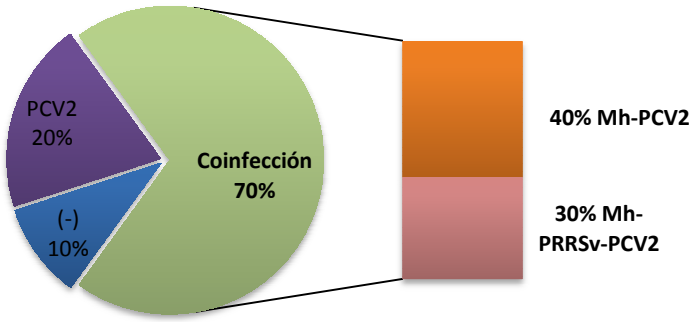


Gráfico 17: Detección de coinfección entre Mh, PRRSv y PCV2 en Gran Canaria. Porcentaje de explotaciones en las que se detectó inmunidad frente a varios agentes etiológicos.

✓ ***SEROLOGÍA LONGITUDINAL***

Se realizó un segundo análisis a 31 reproductores evaluados en la serología transversal. El PC+ y PC– para Mh y el PC para PRRSv y PCV2, obtenidos en cada ensayo, se especifican en el *Anexos-Tabla 21;* así como, las DOs de cada muestra para los 3 ELISAs realizados.

Comparando el porcentaje de animales con inmunidad obtenidos en ambos muestreos en la población total (31 animales), se observó una disminución considerable del porcentaje de animales con títulos de Acs positivos (42%,13 a 19%,6) frente a Mh. La inmunidad frente a PRRSv y PCV2 en la población se mantuvo más estable. En el caso de PRRSv se observó muy poca variación, disminuyendo el porcentaje de animales con Acs (3%, 1), hasta desaparecer (0%) en el segundo muestreo. En el caso de la inmunidad frente a PCV2, hubo un aumento casi inapreciable en el número de animales con Acs de tipo IgG (68%, 21 a 71%, 22). Sin embargo, no se evidenció infección reciente de PCV2, al no observarse animales con IgM en el segundo muestreo, lo que indica que al aumento de la inmunidad fue debida a una infección antigua (>2 meses) (Gráfico 18).

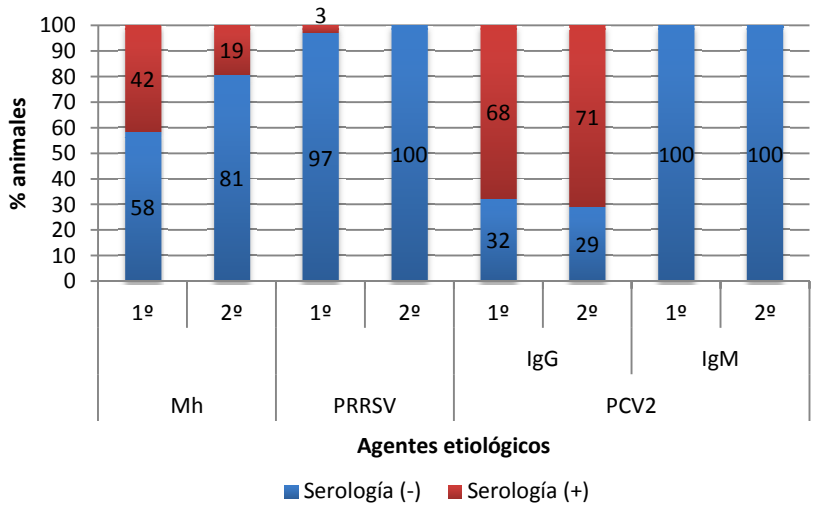


Gráfico 18: Serología longitudinal en Gran Canaria. Inmunidad frente a Mh, PRRSv y PCV2. Porcentaje de animales positivos (Serología +) y negativos (Serología -) en el primer (1º) y segundo (2º) muestreo realizado para la detección de Ac frente Mh, PRRSv y Acs de tipo IgG e IgM frente a PCV2.

Se analizó la dinámica seguida por los Acs, comparando los valores de DO para cada individuo (*Anexos-Tabla 21*). En el caso de Mh, de aquellos animales en los que no se detectó Acs en el primer muestreo, un 22% presentó seroconversión en el segundo y el 78% restante continuó siendo negativo. Estos resultados ponen en evidencia la circulación de Mh en las explotaciones, si bien, la presión de infección parece haber disminuido puesto que en la población total se observó una disminución del porcentaje de animales con inmunidad. La situación se mantuvo estable para PRRSv. Por último, en el caso de PCV2, se observó seroconversión en un 10% de los animales para IgG. El resto de los animales mantuvieron los mismos niveles de Acs IgG e IgM (Gráfico 19).

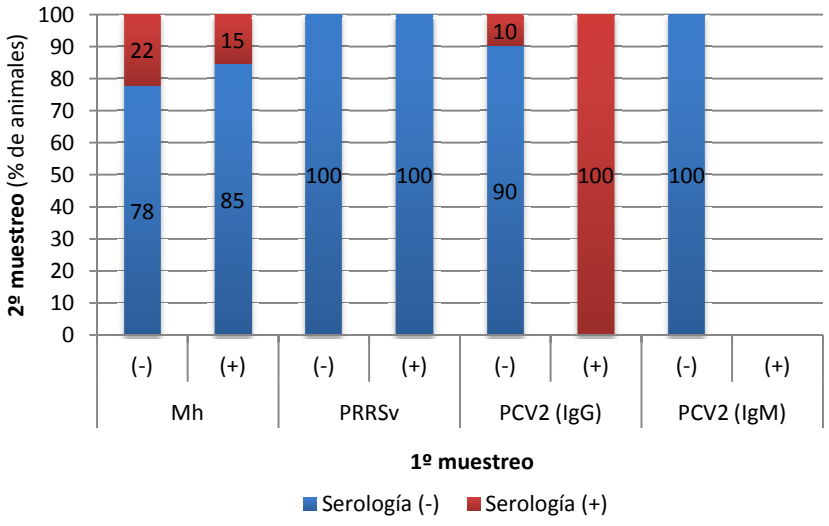


Gráfico 19: Dinámica seguida por los Acs frente a Mh, PRRSv y PCV2 en la Serología longitudinal. Porcentaje de animales sin (-) o con (+) inmunidad frente a Mh, PRRSv y PCV2 (IgG/IgM) en el primer muestreo que presentaron serología negativa (-) o positiva (+) en el segundo.

4.3.1.2 SEROPREVALENCIA DE MH, PRRSV Y PCV2 EN LANZAROTE

Se seleccionaron al azar 42 animales reproductores pertenecientes a 8 explotaciones de CNC ubicadas en la isla de Lanzarote.

La técnica fue validada siguiendo el protocolo del laboratorio, resultando positivas para Mh aquellas muestras cuya DO a 450nm fue igual o inferior al PC+, negativas aquellas cuya DO fue igual o superior al PC- y dudosas aquellas que se encontraron entre ambos valores. En el caso de los ELISAs realizados para PRRSv y PCV2, las técnicas también fueron validadas según las indicaciones del laboratorio, resultando positivas aquellas muestras cuya DO fue igual o superior al PC y negativas aquellas que presentaban valores inferiores. Los PCs para cada ensayo y las DOs de las muestras para los 3 ELISAs realizados (Mh, PRRSv y PCV2) se recogen en el *Anexos-Tabla 23)*.

Del total de 42 animales estudiados, el 19% (8) presentó Acs frente a Mh, el 10% (4) frente a PRRSv y frente a PCV2 un 33% (14) presentó Acs de tipo IgG y ningún animal presentó Acs de tipo IgM (Gráfico 20).

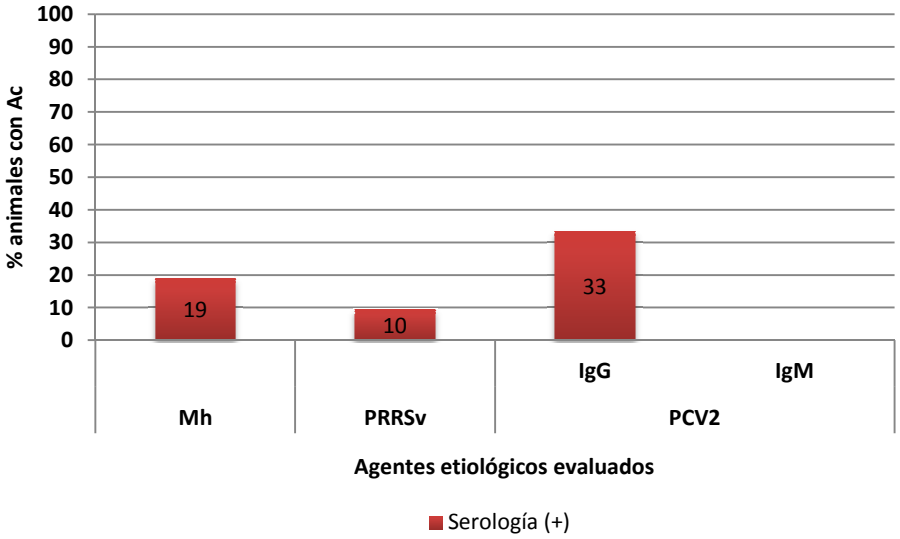


Gráfico 20: Seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 en Lanzarote. Porcentaje de animales con inmunidad (Serología +) frente a los agentes etiológicos evaluados.

Evaluando la presencia de coinfecciones entre los distintos agentes etiológicos en las explotaciones evaluadas en Lanzarote (8), se observó coinfección entre Mh y alguno de los agentes víricos estudiados en un 38% (3). Así un 12% (1) de las explotaciones presentó coinfección entre Mh y PRRSv, un 13% (1) frente a Mh y PCV2 y el 13% (1) restante presentó coinfección entre los 3 agentes etiológicos. En ningún caso se detectó coinfección entre los agentes víricos sin la participación de Mh. Un 50% (4) de las explotaciones presentó Acs frente a un único agente etiológico (PCV2). Finalmente, se observó que el 12% (1) restante no presentó Acs frente a ningún agente (Gráfico 21).

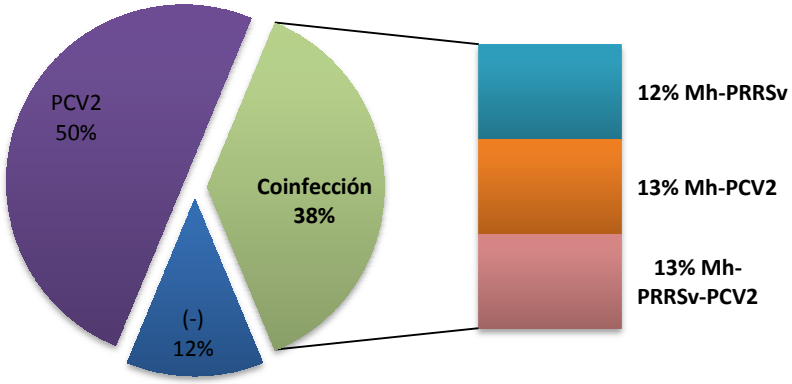


Gráfico 21: Detección de coinfección entre Mh, PRRSv y PCV2 en Lanzarote. Porcentaje de explotaciones en las que se detectó inmunidad frente a varios agentes etiológicos.

4.3.1.3 SEROPREVALENCIA DE MH, PRRSV Y PCV2 EN TENERIFE

Se seleccionaron al azar 41 animales reproductores pertenecientes a 11 explotaciones de CNC ubicadas en la isla de Tenerife.

La técnica fue validada siguiendo el protocolo del laboratorio, resultando positivas para Mh aquellas muestras cuya DO a 450nm fue igual o inferior al PC+, negativas aquellas cuya DO fue igual o superior al PC- y dudosas aquellas que se encontraron entre ambos valores. El valor del PC+ y – para Mh y del PC para PRRSv y PCV2, obtenidos en cada ensayo, se especifican en el *Anexos-Tabla 24*, así como las DOs de cada muestra para los 3 ELISAs realizados.

Del total de los animales evaluados en la isla de Tenerife un 10% de los animales (4) presentó Acs frente a Mh y PRRSv. Se detectó Acs de tipo IgG frente a PCV2 en un elevado porcentaje de animales (83%, 34) y de tipo IgM en el 5% (2). Al comparar los valores de DO para IgM e IgG en estos 2 animales (*Anexo Serología, Tabla IV*), se observó que presentaban infección reciente de uno o dos meses de antigüedad (DO IgG>DO IgM, IgM>1/100) (Gráfico 22).

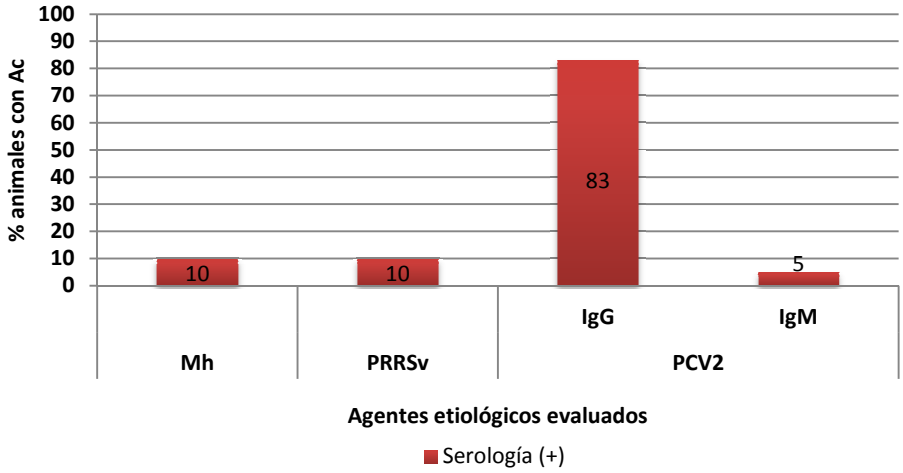


Gráfico 22: Seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 en Tenerife. Porcentaje de animales con inmunidad (Serología (+) frente a los agentes etiológicos evaluados.

Al analizar la presencia de Acs frente a los distintos agentes etiológicos (Mh, PRRSv y PCV2) en las distintas explotaciones inspeccionadas en Tenerife (11), se observó coinfección entre PCV2 y alguno de los otros agentes etiológicos en el 54% (6) de las explotaciones. Así un 9% (1) presentó coinfección entre PCV2 y Mh, un 36% (4) entre ambos agentes víricos (PCV2 y PRRSv) y el 9% (1) restante entre los 3 agentes etiológicos. En ningún caso se detectó coinfección sin la participación de PCV2. Finalmente, en las explotaciones en las que no se observó coinfección entre los distintos agentes (46%, 5), también se detectó PCV2 (Gráfico 23).

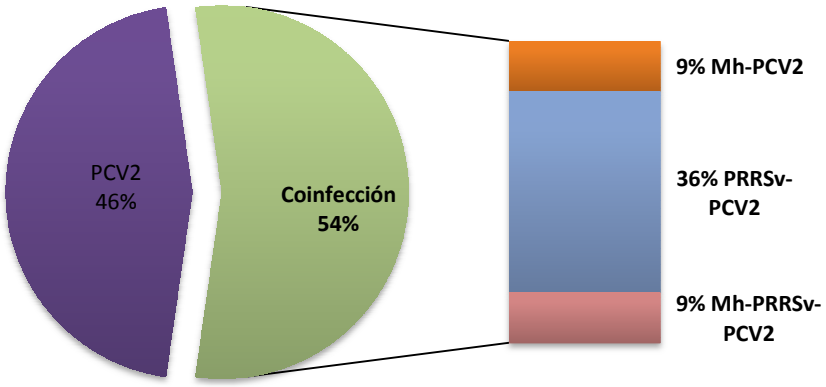


Gráfico 23: Detección de coinfección entre Mh, PRRSv y PCV2 en Tenerife. Porcentaje de explotaciones en las que se detectó inmunidad frente a varios agentes etiológicos.

4.3.1.4 SEROPREVALENCIA DE MH, PRRSV Y PCV2 EN LA PALMA

Se seleccionaron 18 animales reproductores pertenecientes a 6 explotaciones de CNC ubicadas en la isla de La Palma.

La técnica fue validada siguiendo el protocolo del laboratorio, resultando positivas para Mh aquellas muestras cuya DO a 450nm fue igual o inferior al PC+, negativas aquellas cuya DO fue igual o superior al PC- y dudosas aquellas que se encontraron entre ambos valores. En el caso de los ELISAs realizados para PRRSv y PCV2, las técnicas también fueron validadas según las indicaciones del laboratorio, resultando positivas aquellas muestras cuya DO fue igual o superior al PC y negativas aquellas que presentaban valores inferiores al PC. El valor del PC+ y PC- para Mh y del PC para PRRSv y PCV2, así como las DOs de las muestras para los 3 ELISAs realizados se recogen en el *Anexo Serología, Tabla V.*

De los animales evaluados, se observó un 17% (3) de los animales con títulos de Acs frente a Mh y un 6% (1) con Acs frente a PRRSv. En relación a PCV2, se observó un 89% (16) de los animales con Acs de tipo IgG y un 11% (2) con Acs de tipo IgM (Gráfico 24), presentando infección activa (DO IgM>DO IgG, IgM>1/100) el 50% (1) de estos animales e infección reciente (DO IgG>DO IgM, IgM>1/100) el 50% (1) restante (*Anexos-Tabla 25*).

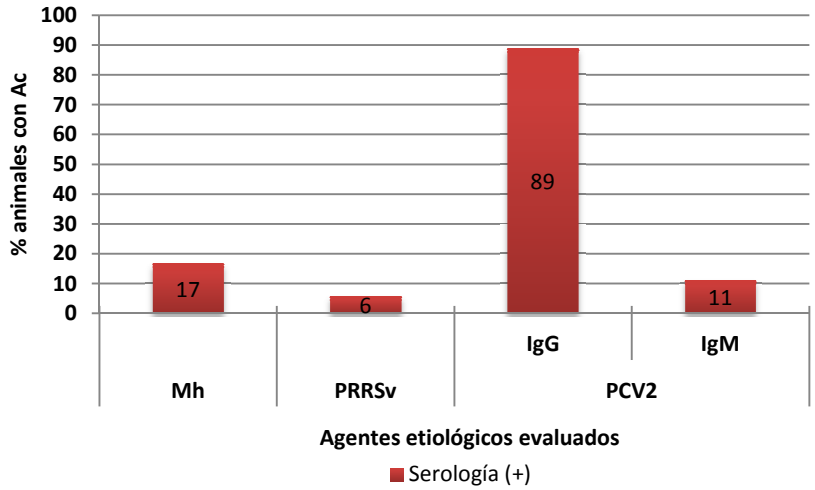


Gráfico 24: Seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 en La Palma. Porcentaje de animales con inmunidad (Serología +) frente a los agentes etiológicos evaluados.

Se detectaron Acs frente a PCV2 en el 84% de las explotaciones (5), de forma única en un 50% (3), en combinación con Mh en un 17% (1) y con Mh y PRRSv en otro 17% (1). Se detectaron títulos de Acs frente a Mh de forma única en 16% (1) de las explotaciones. Sólo se detectaron Acs frente a PRRSv en explotaciones que además presentaban Acs frente a Mh y PCV2 (16%, 1) (Gráfico 25).

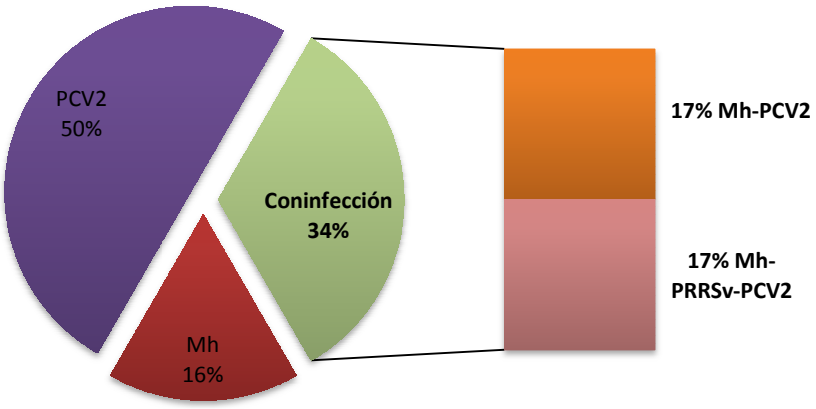


Gráfico 25: Detección de coinfección entre Mh, PRRSv y PCV2 en La Palma. Porcentaje de explotaciones en las que se detectó inmunidad frente a varios agentes etiológicos.

4.3.2 RESUMEN DE SEROPREVALENCIA DE MH, PRRSV Y PCV2 Y COINFECCIONES OBSERVADAS

A continuación se resume la seroprevalencia observada frente a Mh, PRRSv y PCV2 en el archipiélago y por islas, así como la detección de coinfección entre los distintos agentes etiológicos evaluados en las diferentes explotaciones.

Tabla 18: Resumen de la seroprevalencia y coinfecciones observadas para Mh, PRRSv y PCV2 en las explotaciones de CNC. Coinfecciones entre Mh-PRRSv (a), Mh-PCV2 (b), PRRSv-PCV2 (c) y Mh-PRRSv-PCV2 (d).

Localización	**Seroprevalencia** (%)			**Coinfección** (%)					**Infección única** (%)			**Libre** (%)
(nºejemp/nºexp)	Mh	PRRSv	PCV2	(a)	(b)	(c)	(d)	TOTAL	Mh	PRRSv	PCV2	---
Las Palmas												
Gran Canaria *(228/10)*	18%	2%	56%	---	40%	---	30%	70%	---	---	20%	10%
Lanzarote *(42/8)*	19%	10%	33%	12%	13%	---	13%	38%	---	---	50%	12%
Santa Cruz												
Tenerife *(41/11)*	10%	10%	83%	---	9%	36%	9%	54%	---	---	46%	---
La Palma *(18/6)*	17%	6%	89%	---	17%	---	17%	34%	16%	---	50%	---
TOTAL												
(329/35)	11%	4%	57%	3%	20%	11%	17%	51%	3%	---	40%	6%

4.3.3 USO DE EXTRACTOS DE TEJIDO PULMONAR EN TÉCNICAS DE ELISA

Se realizó técnicas de ELISA para la detección de Acs frente a Mh, PRRSv y PCV2 empleando muestras de extracto de tejido pulmonar y suero sanguíneo de 18 animales (Mh, 16). Se comparó el porcentaje de animales con resultados serológicos positivos y negativos obtenidos en función del tipo de muestra empleada (*Anexos-Tabla 22*). Además se realizó un análisis estadístico para evaluar el grado de coherencia entre los valores de DOs obtenidos en cada animal para cada tipo de muestra (suero *vs* extracto de tejido pulmonar).

Al analizar el porcentaje de animales con inmunidad se observó que, en el ELISA realizado para la detección de Acs frente a Mh, el 100% (16) de los animales no presentó inmunidad, independientemente de la muestra analizada. Se detectaron Acs frente a PRRSv, en suero sanguíneo en el 11% (2) de los animales y en extractos de tejido pulmonar en el 6% (1). En el caso de PCV2, se detectaron Acs de tipo IgG en suero sanguíneo en el 89% (16) de los animales y en extracto pulmonar en el 94% (17) y, Acs de tipo IgM en el 6% (1) de los sueros sanguíneos, no observándose inmunidad al analizar los extractos pulmonares (Gráfico 26).

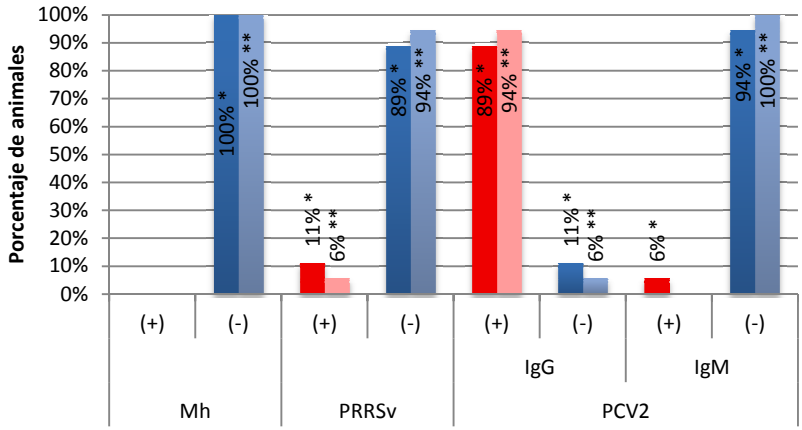


Gráfico 26: Detección de Acs frente a Mh, PRRSv y PCV2 en suero sanguíneo (*) y extractos de tejido pulmonar (**) en animales inspeccionados en matadero.

4.3.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis estadístico, para determinar la concordancia entre el número de animales positivos y negativos obtenidos mediante el test de ELISA utilizando los dos tipos de muestras analizados (suero sanguíneo y extracto de tejido pulmonar).

Se estimó el estadístico Kappa para cada test de ELISA (Mh, PRRSv y PCV2), considerando una concordancia moderada cuando el estadístico Kappa se encontraba comprendido dentro del intervalo 0,41-0,60; bueno si estaba dentro del intervalo 0,61-0,80 y finalmente muy bueno si kappa era mayor que 0,8.

La concordancia estimada entre los tests de ELISA realizados con suero sanguíneo y extracto de tejido pulmonar fue buena en los test de ELISA realizados frente a PRRSv (Kappa 0,640) y PCV2 (IgG) (Kappa 0,640), no pudiéndose calcular ningún estadístico para Mh y PCV2 IgM (serología negativa), al considerarse los valores para los extractos pulmonares como una constante (0), asumiéndose por tanto la hipótesis alterativa (Tabla 19).

Tabla 19: Estimación del estadístico Kappa como medida de concordancia entre los test de ELISA realizados con suero sanguíneo (suero) y extracto de tejido pulmonar (EP) para la detección de Acs frente a Mh, PRRSv y PCV2 (IgG/IgM).

		Mh-EP		
		(-)	(+)	Kappa (**SE**)
Mh-Suero	(-)	15	0	0.000[a] (0.000[b])
	(+)	1	0	

[a]No se calculará ningún estadístico porque Mh_EP_d es una constante.
[b]Asumiendo la hipótesis alternativa

		PRRSv-EP		
		(-)	(+)	Kappa (SE)
PRRSv-Suero	(-)	16	0	0.640 (0.326)
	(+)	1	1	

		PCV2-IgG-EP		
		(-)	(+)	Kappa (SE)
PCV2-IgG-Suero	(-)	1	1	0.640 (0.326)
	(+)	0	16	

		PCV2-IgM-EP		
		(-)	(+)	Kappa (SE)
PCV2-IgM-Suero	(-)	17	0	0.000[a] (0.000[b])
	(+)	1	0	

[a]No se calculará ningún estadístico porque PCV2_IgM_EP_d es una constante
[b]Asumiendo la hipótesis alternativa

Además se calculó el coeficiente de correlación de Pearson, para cada test de ELISA (Mh, PRRSv y PCV2) a partir de los valores de DO obtenidos para cada variable (suero sanguíneo y extracto de tejido pulmonar.

En todos los test de ELISA realizados (Mh, PRRSv y PCV2 IgG/IgM) se observó una correlación lineal positiva entre ambas variables. En el ELSA realizado para la detección de Acs frente a Mh se observó un coeficiente de correlación de Pearson bajo (correlación=0.397) entre las variables suero sanguíneo y extracto de tejido pulmonar. En el caso del ELISA para PRRSv se observó un coeficiente de correlación alto (correlación=0.822). En el ELISA realizado para la detección de Acs de tipo IgG frente a PCV2 se observó un coeficiente de correlación de Pearson muy alto (correlación=0.922), sin embargo el coeficiente de correlación para la detección de Acs de tipo IgM fue moderado (correlación=0.584) (Gráfico 27).

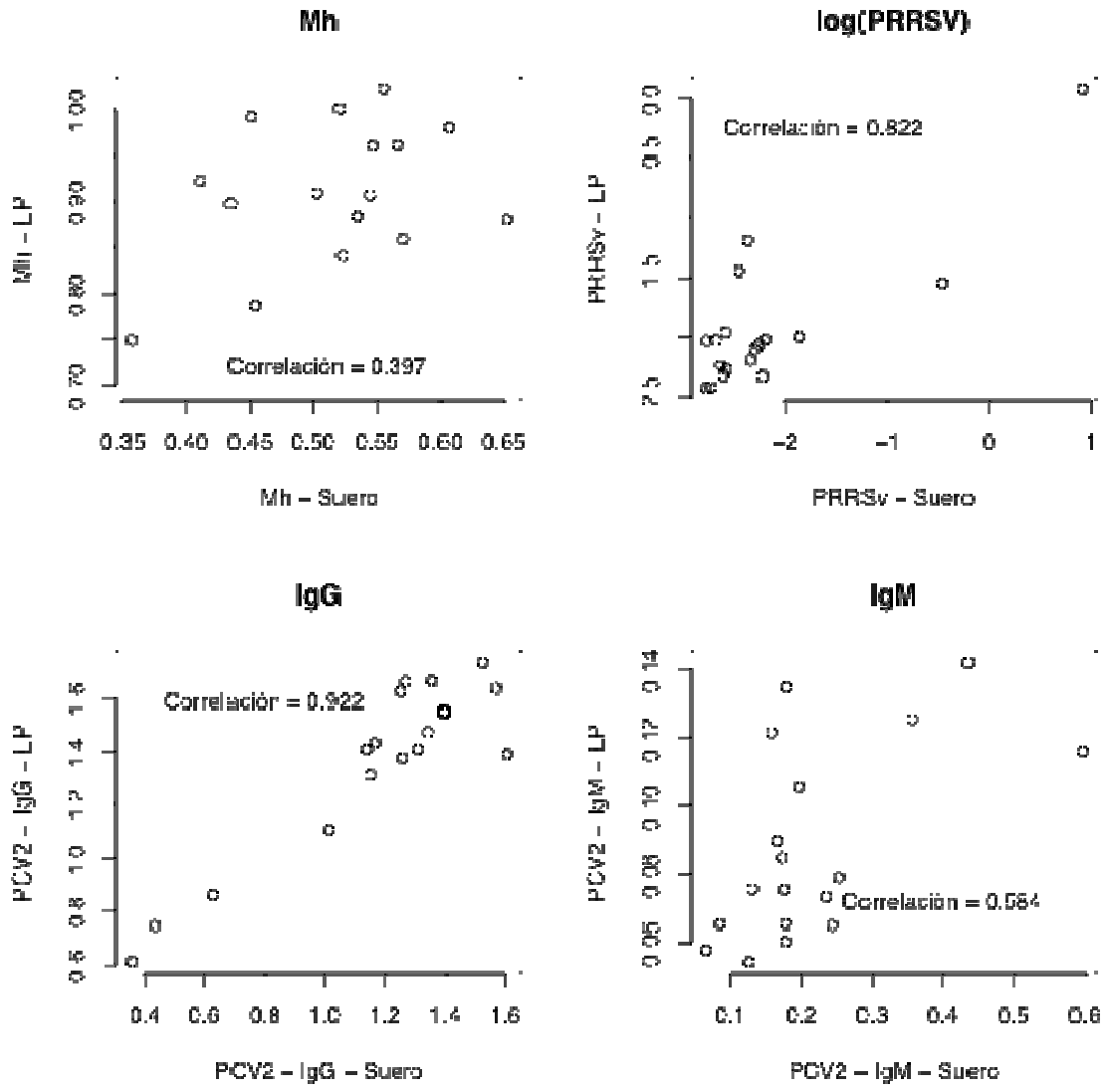


Gráfico 27: **Coeficiente de correlación lineal de Pearson para la detección de Acs frente a Mh, PRRSv y PCV2 (IgG/IgM) entre las variables suero sanguíneo (suero) y extracto de tejido pulmonar (EP).** En el caso de PRRSv se calculó la correlación en base logarítmica.

DISCUSIÓN

5.

5 DISCUSIÓN

5.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

5.1.1 LA RAZA

En la conservación de la biodiversidad, un aspecto importante es el mantenimiento de la variabilidad genética de las especies domésticas. La conservación de los recursos genéticos es primordial, porque contribuyen al desarrollo de los ecosistemas, al desarrollo sostenible y mantenimiento de la población rural. Desde el punto de vista biológico, el mantenimiento de la variabilidad de los animales domésticos es imprescindible para superar el límite de selección y asegurar la capacidad de adaptación para satisfacer las necesidades de la sociedad en el futuro. A nivel cultural, tienen una gran importancia, son el reflejo de las migraciones, invasiones y culturas de las distintas poblaciones en un determinado territorio. Por último, permiten una diversificación de los productos, para satisfacer las demandas de los consumidores (productos de calidad, genuinos y perfectamente diferenciados) (Molina, 2010; Pastor y cols., 2010).

En 1992, se reconoce a las especies domésticas como un elemento importante de la diversidad biológica mundial y la necesidad de conservar estos Recursos Genéticos de Animales Domésticos (RGAD) (Molina, 2010). En 2003, la FAO publicó la Lista de Vigilancia Mundial para los animales domésticos, reconociendo cerca de 7500 razas de animales domésticos, incluidas las razas autóctonas. Según datos del 2007, el 20% de los RGAD se encuentra en peligro de extinción, reconociéndose un 28% en Europa (FAO, 2007).

En la actualidad existen casi 100 razas porcinas domésticas reconocidas en el mundo, considerándose en peligro de extinción el 18% de ellas. Según la última actualización del **Catálogo Oficial de Razas Españolas** (Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre, por el que se establece el Programa Nacional de Conservación, Mejora y Fomento de las Razas Ganaderas), en nuestro país quedan reconocidas 13 razas autóctonas de porcino, 10 de ellas en **peligro de extinción** (Celta, Chato Murciano, Euskal Txerria, Gochu Asturcelta, Ibérico, (variedad Lampiño, Manchado de Jabugo y Torbiscal), Negra Mallorquina y **Negra Canaria**), lo que pone en evidencia la grave situación en la que se encuentran los recursos genéticos animales en nuestro país.

El Cerdo Negro Canario (CNC) es la única raza porcina autóctona reconocida en Canarias. Son animales de gran rusticidad, muy bien adaptados al medioambiente y al clima de las islas. Se cree que deriva de poblaciones porcinas de diferentes regiones, llegadas al archipiélago desde el Norte de África, Mediterráneo Oriental, Península Ibérica e Islas Británicas, dando origen a un grupo multirracial diferenciado (García y Capote 1982; Robert y cols., 2000). Es una raza con gran importancia dentro del patrimonio genético mundial, quedando como un reducto de recursos genéticos porcinos norteafricanos, actualmente extintos. Gama y cols., en 2013, situaron al CNC, mediante estudios filogenéticos, dentro del grupo de razas celtas, junto con razas portuguesas (Bísaro y Malhado de Alcobaça) y otras razas españolas (Celta y Chato Murciano).

A mitad del siglo pasado el auge de los cruces con cerdos blancos, la industria cárnica, la aparición de los sistemas en intensivo y la presión del mercado hacia carnes más magras, ocasionó prácticamente, la desaparición de las razas porcinas españolas autóctonas. Al igual que ocurre en otras razas autóctonas como el Chato Murciano (Peinado y cols., 2009), el CNC presenta características zootécnicas diferentes a las descritas para las razas comerciales.

En el año 2000, se referenció, en el archipiélago, un censo total de CNC de 283 ejemplares (Robert y cols., 2000), quedando incluida en el Catálogo oficial de las Razas de Ganado de España (Anexo I del Real Decreto 2129/2008), como Raza autóctona en peligro de extinción. Gracias al esfuerzo de instituciones públicas y de ganaderos, agrupados en la ACCNC, el censo ha aumentado considerablemente. En 2007, se reabre el Registro Fundacional del Libro Genealógico de la raza porcina NC (Orden de 27 de abril de 2007, según lo previsto en la ORDEN de 13 de agosto de 2001), que cuenta además con un Registro Auxiliar, de Nacimientos y Definitivo; seleccionando y preservando así, el estándar racial al minimizar la consanguinidad (Orden de 5 de agosto de 2014). En 2011, se elaboró un Programa de conservación de la raza (Resolución nº 251 de 29 de febrero de 2012), para controlar la consanguinidad, mantener la genuinidad de la raza e incrementar el tamaño real y efectivo de la población. Actualmente se encuentran registrados en el LG, según datos oficiales, un total de 450 hembras reproductoras y 90 machos, repartidos en 66 explotaciones (*Fuente,* MAGRAMA).

El CNC tiene una gran importancia tanto a nivel medioambiental como sociocultural debido al aprovechamiento sostenible de subproductos agrícolas y ganaderos, y por el elevado valor alimentario de su carne y su carácter diferenciado. En la actualidad, se promueve la elaboración de productos de calidad que cumplan con los requisitos demandados por el consumidor, entendiéndose la calidad, no sólo desde el punto de vista bromatológico, sino también medioambiental; con una producción sostenible, intentando preservar el medio ambiente y el bienestar animal, todo ello cumpliendo con las exigencias sociales.

Uno de los aspectos a tener en cuenta en la conservación de la biodiversidad, es la **sanidad animal**. Entre los peligros que amenazan al mantenimiento de los RGAD, se encuentran aquellas enfermedades compartidas entre la fauna doméstica y la salvaje, las cuales aparte de la muerte de individuos, presentan la dificultad de que, en determinados casos, la fauna salvaje y/o de vida libre puede actuar como reservorios de enfermedades, algunas de ellas zoonósicas. Las medidas de lucha contra determinadas enfermedades, en los animales domésticos, puede llevar al sacrificio de animales y a restricciones de movimientos, impidiendo el intercambio de animales entre explotaciones, y condicionando sustancialmente la recuperación de especies en peligro de extinción (Pastor y cols., 2010).

El CNC es considerado una raza doméstica y en algunos casos comparten instalaciones con cerdos híbridos. Éste, y otros factores de riesgo, hacen que la raza de CNC pueda verse amenazada por el desarrollo de enfermedades ampliamente descritas en razas porcinas comerciales (Stark y cols., 1992); causando problemas productivos, como retraso en el crecimiento; reproductivos, afectando a la fertilidad, prolificidad, etc.; así como, un aumento en la mortalidad de los individuos. Estos aspectos, en su conjunto, afectarían negativamente al número de individuos de una raza, ya de por sí amenazada y en peligro de extinción. A pesar de la mayor importancia que adquiere la sanidad animal en una raza de estas características, se desconoce cuál es su estado sanitario y como le afectan las enfermedades presentes en las razas híbridas. Sólo existen datos aislados a partir de estudios individuales de animales remitidos para necropsia, o datos obtenidos de estudios serológicos preliminares, realizados en Gran Canaria, que indicaban un escaso contacto de estos animales con algunos de los agentes etiológicos involucrados en el desarrollo de enfermedades respiratorias (Andrada, 2008). Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de realizar estudios epidemiológicos y etiopatogénicos más completos.

5.1.2 COMPLEJO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS PORCINAS

En la industria porcina convencional, una de las enfermedades observadas con mayor frecuencia y que más pérdidas económicas generan en todo el mundo son las enfermedades respiratorias (Sorensen y cols., 2006). Numerosos estudios describen la participación de un gran número de agentes etiológicos bacterianos y víricos en la patogénesis de estas enfermedades y, juntos dan lugar al complejo de enfermedades respiratorias porcina (*Porcine Respiratory Disease Complex,* PRDC) (Yagihashi y cols., 1984; Halburg 1998; Thacker 2001; Brockmeier y cols., 2002; Harms y cols., 2002; Bochev y cols., 2007; Hansen y cols., 2010c; Opriessnig y cols., 2011; Fablet y cols., 2012b;). Este síndrome se caracteriza por causar bajo peso, disminución en la eficacia de la conversión alimentaria, anorexia, letargia, fiebre, tos y disnea que afecta al porcino principalmente entre las 14-22 semanas de edad (Halburg, 1998; Sibila y cols., 2009; Thacker 2001a; Opriessnig y cols., 2011), con un rango de morbilidad del 10-40% y de mortalidad que oscila entre 2-10% (Thacker 2001b; Harms y cols., 2002; Risco y cols., 2015).

Generalmente, los patógenos primarios, involucrados en el desarrollo del PRDC, suelen ser víricos o micoplasmas, y los secundarios bacterianos (Van Alstine, 2012). Dentro de los agentes víricos más frecuentemente descritos en el cerdo doméstico, criado en sistemas de producción intensivos, se incluye al PRRSv, PCV2, CSF, SIv, ADV, PRV, y recientemente TTv (Brockmeier y cols., 2002, Ellis y cols., 2008; Krakowka y Ellis, 2008; Hansen y cols., 2010c; Lang, 2010; Thacker y cols., 2010). Agentes bacterianos como Mh y App, han sido descritos como patógenos primarios y bacterias como *P. multocida, H. parasuis,* entre otras, como secundarios u oportunistas (Brockmeier y cols., 2002). El PRDC se ha descrito como una neumonía enzoótica, en la que Mh está íntimamente involucrado, agravada por virus respiratorios y bacterias oportunistas (Thacker 2006; Sibila y cols., 2009). Hansen y cols., (2010c) destacan la importancia de PCV2, Mh, *M. hyorhinis* y *P. multocida* en el desarrollo del PRDC, siendo Mh significativamente frecuente en los casos de bronconeumonía, describiéndose en coinfección con PRRSv o *Strep. suis.*

La presentación del PRDC es extremadamente variable entre países, regiones, explotaciones y los distintos sistemas de producción. Su severidad puede fluctuar dentro de una misma explotación a lo largo del tiempo, influenciadas por variaciones de las condiciones ambientales, de manejo y factores genéticos, entre otros (Dee, 1996; Brockmeier y cols., 2002; Thacker y cols., 2010; Opriessnig y cols., 2011).

La elevada predisposición que presentan los cerdos domésticos a padecer múltiples enfermedades respiratorias, generalmente se asocia a la producción intensiva en recintos cerrados, quedando expuestos a contaminantes vehiculados por el aire (polvo, gases tóxicos, micotoxinas y endotoxinas) (Sorensen y cols., 2006). Sin embargo, en los animales criados al aire libre también se puede observar el desarrollo de patologías a nivel respiratorio (Cabaret y cols., 2003; Risco y cols., 2015).

El CNC se cría en sistemas en extensivo o semiextensivo, en una amplia variedad de explotaciones, encontrándonos desde explotaciones de carácter reducido o familiar, hasta núcleos de producción más amplios y con un mejor diseño y manejo (García y cols., 2011). Esta diversidad de las instalaciones es un factor a tener en cuenta, ya que se traduce en una amplia variedad de programas sanitarios. Al contrario de lo que ocurre en la producción intensiva de razas híbridas, en donde, con frecuencia, se realizan programas de vacunación para la inmunización de los animales frente a distintos agentes patógenos, en la mayoría de las explotaciones de CNC no se vacuna. En las explotaciones incluidas en el presente estudio no se seguía plan de vacunación frente a ningún agente etiológico.

Debido a la falta de un registro sistemático hasta la implementación del LG de la raza, y en consecuencia a la escasa información sobre al número de ejemplares existentes, así como su localización y distribución, y a la diversidad de los sistemas productivos, hasta el momento no se habían realizado estudios para evaluar el estatus sanitario de las explotaciones de CNC. En consecuencia, tampoco existen datos epidemiológicos referidos a la incidencia que tienen, en este colectivo, las enfermedades respiratorias.

Para la discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio, se ha empleado la bibliografía actual sobre el desarrollo del PRDC, descrita en animales de producción intensiva en confinamiento, así como la referente a sistemas de producción al aire libre (el cerdo ibérico) y en animales salvajes (jabalíes).

La mayoría de los patógenos involucrados en el desarrollo del PRDC en el cerdo doméstico también han sido detectados en jabalíes, salvajes o criados en explotaciones, y en el cerdo ibérico. Así, la primera detección de Acs frente a PRRSv en el jabalí fue en Alemania (Oslage y cols., 1994). En la Península Ibérica se detectó mediante técnicas de ELISA en 2011 (Closa-Sebastià y cols., 2011). La detección de PCV2, en jabalíes, se describió por primera vez en España en 2004 mediante técnicas de IPMA, IHQ e ISH (Vicente y cols., 2004) y posteriormente la descripción de lesiones histopatológicas compatibles con infección de Mh, así como la detección de Acs mediante técnicas de ELISA (Sibila y cols., 2010). Además, *P. multocida* y *H. parasuis*, en España y PRRSv en Italia, han sido identificados utilizando diferentes métodos de diagnóstico directo en animales enfermos (Bonilauri y cols., 2006; Cuesta y cols., 2013; Risco y cols., 2013).

En el Archipiélago Canario, y concretamente en la isla de Gran Canaria, se ha referenciado la presencia de estos agentes etiológicos involucrados en el desarrollo del PRDC en explotaciones de porcino de razas híbridas. Se ha detectado Mh (Andrada, 2001; Sarradell y cols., 2003; Assunção y cols., 2005) y PCV2 (Andrada y cols., 2000) en animales de matadero y asociado a casos clínicos, así como la coinfección de varios patógenos dando lugar al PRDC (Quesada-Canales, 2015; Paz-Sánchez, 2011).

La incidencia y prevalencia de las enfermedades respiratorias depende del equilibrio entre la presión infectiva y la capacidad de los animales para resistir a esta presión mediante su eficiente respuesta inmunológica. La neumonía enzoótica es un claro ejemplo de enfermedad respiratoria donde se han realizado numerosos estudios para la erradicación del Mh, en granjas, así como en áreas y/o regiones geográficas concretas. Por otro lado, en los últimos años, en la industria porcina ha aumentado la incidencia de nuevas enfermedades emergentes como el PRRS y el PMWS asociado a PCV2, originando un incremento significativo en la importancia de enfermedades respiratorias en muchas explotaciones (Sorensen y cols., 2006).

En la vigilancia de las enfermedades respiratorias el principal objetivo es identificar, no solo las enfermedades clínicas, sino también las enfermedades subclínicas. El **diagnóstico definitivo de las enfermedades respiratorias** debe basarse en la combinación de la historia clínica, necropsias, evaluación de las lesiones macroscópicas y microscópicas, la monitorización en matadero, así como la realización de diversas técnicas laboratoriales, donde quedarían incluidas técnicas como la IHQ, para la detección de Ags de los distintos agentes etiológicos, o la serología, para la detección de Acs frente a estos patógenos. Dependiendo del agente que se pretenda evaluar se recomiendan distintas estrategias y métodos de diagnóstico (Van Alstine 2012).

En el CNC, este aspecto además adquiere una mayor relevancia, puesto que se trata de una población que se encuentra en peligro de extinción y por tanto, el padecimiento de este tipo de enfermedades podría generar además una reducción en el número de ejemplares. Por este motivo en la presente tesis nos planteamos el **conocer el desarrollo de enfermedades respiratorias en el CNC, apoyándonos en el examen post-mortem e inspección en matadero, realizando estudios anatomopatológicos e inmunohistoquímicos, así como estudios serológicos en las explotaciones, para evaluar la posible participación de Mh, PRRSv y PCV2 como agentes patógenos involucrados en el desarrollo del PRDC en esta raza.**

5.2 ESTUDIO SEROLÓGICO

En los últimos años ha habido una evolución importante en la biotecnología, lo que ha acelerado el desarrollo de nuevos tests de laboratorio nuevos, altamente específicos y sensibles para el diagnóstico de las enfermedades respiratorias (Sorensen y cols., 2006).

El estudio serológico con frecuencia se emplea para conocer el estado sanitario en las explotaciones de porcino. El test de ELISA es un método que, de forma rápida, relativamente barata y fácilmente automatizada, proporciona información útil sobre la presencia de Acs maternales y adquiridos, así como el momento en el que se produce seroconversión en los animales (Sibila y cols., 2009). Si bien, se ha demostrado que su interpretación debe ser cautelosa cuando se emplea como único método diagnóstico para determinar la presencia de microorganismos en una explotación (Thacker, 2004). Con frecuencia, se realizan técnicas de ELISA para la detección de Acs frente a los agentes patógenos involucrados en el desarrollo del PRDC, incluidos Mh, PRRSv y PCV2 (Cheon y cols., 1997; Segalés y cols., 2005b; Sibila y cols., 2009).

Para conocer el estado inmunitario de los ejemplares de CNC, distribuidos por el archipiélago, frente a Mh, PRRSv y PCV2, se realizó una serología transversal en 329 ejemplares (lechones, animales de cebo y reproductores) de 35 explotaciones distribuidas entre Gran Canaria (10), Lanzarote (6), Tenerife (11) y La Palma (8). Los adultos analizados representaban el 49% de los reproductores registrados en el LG de la raza en ese momento, según datos facilitados por la ACCNC.

Aunque se sabe que la prevalencia del PRDC en el híbrido ronda el 58% (Brockmeier y cols., 2002), desconocemos cual es la prevalencia real en la población de CNC. Asumiendo una prevalencia mínima del 50% en una población de entre 200-500 animales, sería suficiente con un tamaño muestral de n=5. Sin embargo, en el hipotético caso de que la prevalencia del PRDC en esta raza fuera muy baja (5%), para alcanzar un nivel de confianza del 95% en una población de este tamaño sería suficiente con muestrear 55 animales (Muñoz y cols., 2007). De esta manera, el tamaño muestral empleado en este estudio cumple con los requisitos preestablecidos desde el punto epidemiológico para evaluar el PRDC en esta raza.

5.2.1 SEROPREVALENCIA DE MH, PRRSV Y PCV2 EN EL CNC, EN EL ARCHIPIÉLAGO CANARIO

En el presente estudio se ha empleado un kit comercial de ELISA de bloqueo para la detección de Acs frente a Mh, un ELISA indirecto de doble reconocimiento para PRRSv y un kit comercial de ELISA indirecto para PCV2. Este último, nos permitió detectar Acs de tipo IgG e IgM, pudiendo identificar el momento de la infección al comparar los valores para ambas Igs: DO IgM ≥ DO IgG: infección activa (dentro de los primeros 21 dpi); DO IgM < DO IgG, siendo DO IgM positiva: infección reciente (entre los 20 - 50 dpi); valores positivos IgG y negativos para IgM: infección tardía o resuelta (aproximadamente 2 meses después de la infección) (Segalés y cols., 2005b).

Mycoplasma hyopneumoniae es un agente patógeno ubico presente en la mayoría de los países con producción porcina, describiéndose una seroprevalencia comprendida entre un 65-82% (Grosse Beilage y cols., 2009; Fraile y cols., 2010; Fablet y cols., 2012b). En el presente estudio, se detectaron ***Acs frente a Mh*** en la población de CNC fue del ***11,2%***, valor muy inferior al descrito para el cerdo híbrido.

Si bien Mh es un agente patógeno asociado a la producción intensiva de porcino, también se ha detectado en animales salvajes de vida libre, y los resultados obtenidos en el CNC se aproximan a los referenciados en estos animales. Recientemente, se ha observado, en poblaciones de jabalíes de vida libre, una seroprevalencia próxima a 19% en Estados Unidos, Rumanía y Eslovenia (Vengust y cols., 2006; Chiurciu y Raduta, 2014, Baroch y cols., 2015). Otros autores han descrito, en Francia, seroprevalencias elevadas (58%) (Marois y cols., 2008). En España, se ha detectado Acs frente a Mh en un 21-26,6% de los animales (Sibila y cols., 2010; Closà-Sebastia y cols., 2011), contrario a lo descrito en un estudio previo, donde no se detectó inmunidad (Vicente y cols., 2002). En jabalíes criados en explotaciones, se han referenciado seroprevalencias dispares, describiéndose entre un 0% en Finlandia y un 72,5% en Grecia (Hälli y cols., 2012; Marinou y cols., 2015).

En el caso de **PRRSv**, la prevalencia de la enfermedad en el cerdo híbrido se presupone elevada en los países de mayor producción, asumiéndose que la infección puede afectar entre el 69,4-82,8% de las explotaciones y a más del 45,2-57,2% de los animales, según se ha referenciado en algunos países (Bautista y cols., 1993; Hirose y cols., 1995; Cheon y cols., 1997; Maes, 1997; Nodelijk y cols., 2003; Arruda y cols., 2015).

En la población de CNC analizada fue posible detectar ***Acs frente a PRRSv*** *en un* ***4%*** de los animales, porcentaje muy inferior al descrito en cerdos híbridos. Sin embargo, numerosos estudios referencian valores similares en jabalíes y en el cerdo ibérico. Así, en animales de vida libre, se ha detectado, mediante técnicas de ELISA, valores entre 0,8-2,5%, en Estados Unidos, (Saliki y cols., 1998; Corn y cols., 2009; Baker y cols., 2011; Baroch y cols., 2015) y en Europa, entre 0,49% y 9,7% (Albina y cols., 2000; Stankeviciu y cols., 2011; Roic y cols., 2012). Por otra parte, en jabalíes criados en explotaciones, se describen prevalencias comprendidas entre 5,6-8,25% (Albina y cols., 2000; Marinou y cols., 2015). Otros autores han observado valores superiores (12,8% en Grecia; 37,8 % en Italia) (Montagnaro y cols., 2010; Touloudi y cols., 2015). Sin embargo, en otros países como Croacia, Eslovenia o Finlandia no ha sido posible su detección (Zupancic y cols., 2002; Vengust y cols., 2006; Hälli y cols., 2012). En un estudio comparativo, Albina y cols., (2000), observaron prevalencias de PRRSv más bajas en animales de vida libre que en animales criados en explotaciones (1,33% *vs* 8,25%).

En los primeros estudios realizados en España, no fue posible detectar Acs frente a PRRSv en jabalíes de vida libre (Vicente y cols., 2002; Ruiz-Fons y cols., 2006). Posteriormente, se observaron valores entre el 2-3% (Closà-Sebastia y cols., 2011; Boadella y cols., 2012) y Rodríguez-Prieto y cols., (2013) describieron una prevalencia ligeramente inferior en cerdo ibérico (1,25%).

Estudios retrospectivos han demostrado la infección por **PCV2** desde 1962 (Jacobsen y cols., 2009), considerándose un virus ubicuo en la producción del cerdo híbrido de todo el mundo (Allan y Ellis, 2000; Grau-Roma y cols., 2011). En el continente americano se ha descrito una seroprevalencia de PCV2 de 59% (Ramírez-Mendoza y cols., 2009), siendo superior en España (70%) (Rodríguez-Arrioja y cols., 2003). En este trabajo hemos detectado ***Acs frente a PCV2*** en un ***57%*** de la población del CNC, empleado un test de ELISA comercial que identifica Acs de tipo IgG e IgM, y que nos ha permitido detectar un ***5%*** de los animales con ***infección activa o reciente***.

Estudios realizados en el jabalí, también describen prevalencias de PCV2 similares, observándose un 51% en Finlandia, mediante IPMA; un 43% en República Checa, mediante IF y un 25-72% en Estados Unidos, por IF y ELISA (Sedlak y cols., 2008; Corn y cols., 2009; Baker y cols., 2011; Hälli y cols., 2012; Baroch y cols., 2015). En España, el método diagnóstico más comúnmente empleado en estudios realizados en el jabalí es el IPMA, describiéndose seroprevalencias del 47,9-64,6% (Vicente y cols., 2004; Ruiz-Fons y cols., 2006; Closa-Sebastià y cols., 2011; Boadella y cols., 2012).

El ELISA comercial empleado en el presente estudio, también ha sido utilizado en trabajos referenciados en el jabalí. En Alemania y Croacia, se observaron Acs de tipo IgG en el 16-19% y con infección activa o reciente en el 3-8% de los animales (Roic y cols., 2012; Sattler y cols., 2012). Otros autores emplearon dos ELISA del mismo laboratorio (IgG e IgG/IgM) y observaron una seroprevalencia de PCV2 del 56% de los animales estudiados, presentando un 26% de los animales infección reciente (IgG>IgM) y un 2% infección activa (IgM>IgG) (Hammer y cols., 2012). La seroprevalencia de PCV2 en el CNC es similar a la descrita para el cerdo híbrido y jabalíes, lo que refuerza la idea de que este virus es ubicuo, estando presente en todas las poblaciones de razas de porcino, incluida la de CNC.

Al comparar la seroprevalencia de Mh, PRRSv y PCV2 detectada en cada una de las islas, se observó que la presión infectiva generada por Mh fue similar en ambas provincias aunque, ligeramente mayor en Las Palmas (18,5%), que en Santa Cruz (12%). En cuanto a PRRSv, la seroprevalencia observada también fue muy similar, aunque ligeramente mayor, en la provincia de Santa Cruz (8%), que en Las Palmas (6%), si bien se observó en la isla de Gran Canaria una presión infectiva de PRRSv menor que en el resto de las islas analizadas (1%). Por el contrario, en el caso de PCV2, se observó una diferencia importante entre ambas provincias, siendo considerablemente mayor en Santa Cruz (86%) que en Las Palmas (43%).

Estas diferencias podrían deberse a que las comarcas veterinarias de ambas provincias presentaban calificación sanitaria distinta en el control de la enfermedad de Aujeszky. La provincia de Las Palmas fue declarada indemne de la enfermedad de Aujeszky (ORDEN de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de 31 de enero de 2007), declaración que no se hizo efectiva en la comarca veterinaria de Santa Cruz hasta principio de 2012 (ORDEN de 6 de febrero de 2012). Por lo que, según establece la normativa vigente (Real Decreto 360/2009), estaba prohibida la entrada de reproductores de porcino desde la provincia de Santa Cruz a la de Las Palmas, y esto incluía también el intercambio de ejemplares de CNC, manteniéndose por tanto las diferencias de presión infectiva de los agentes patógenos estudiados en el presente trabajo en dicha población.

5.2.2 SEROLOGÍA TRANSVERSAL EN GRAN CANARIA.

En el estudio transversal realizado en la isla de Gran Canaria se analizaron animales de distintas edades, lo que nos permitió conocer el estado inmunitario de los lechones, animales de cebo y reproductores frente a Mh, PRRSv y PCV2. Numerosos autores indican que el desarrollo de las enfermedades respiratorias dependen del sistema de producción y de la presión de infección de los distintos patógenos en las fases de crecimiento y cebo, principalmente de Mh (Sibila y cols., 2004b, Fano y cols., 2007).

Del total de los ***lechones*** analizados se detectó Acs frente a Mh en el ***9%.*** En la inmunidad pasiva frente a Mh, es posible observar la presencia de Acs maternales en el 73-80% de los animales sobre los 20 días de edad, no detectándose a los 49 días (Martelli y cols., 2006). Cuando los títulos iniciales de Acs son elevados pueden persistir hasta los 63 días, si bien la vida media de los Acs maternales es de 16 días aproximadamente (Sibila y cols., 2009). Si asumimos que los Acs detectados en estos lechores eran por inmunidad pasiva, estos resultados podrían deberse: a la edad de los animales al momento del muestreo, a la baja inmunidad de las reproductoras, (Calsamiglia y cols., 1999; 2000) o a una inadecuada ingesta de calostro por los lechones, ya sea en el tiempo (dentro de las primeras 12 horas de vida del lechón) o en la cantidad de calostro ingerido (280 g/kg de peso corporal) (Le Devidich y cols., 1994).

En un ***11% de los animales de cebo,*** se detectó Acs frente a Mh. A esta edad cabría esperar la ausencia de inmunidad maternal, de manera que los Acs detectados son debidos a la circulación de Mh en las explotaciones de CNC e infección de estos animales. Si bien el test de ELISA empleado no permite diferenciar si los Acs detectados son post-infección o vacunales, se descarta esta última posibilidad, puesto que estos animales no habían sido vacunados. Algunos autores han descrito en explotaciones con infección subclínica, la detección de Acs frente a Mh en un 24% de los animales con 18 semanas, produciéndose la seroconversión a las 15-18 semanas de edad. En explotaciones con clínica, observaron Acs en el 52% de los animales con 18 semanas de edad, produciéndose la seroconversión a las 12-15 semanas de edad (Vicca y cols., 2002; Fano y cols., 2005). Por otra parte, en trabajos que reproducen experimentalmente la enfermedad, se describe seroconversión frente a Mh a los 35-42 dpi (Morris y cols., 1995).

En los ***reproductores***, se observaron Acs frente a Mh en un ***30%*** de la población. Debemos tener en cuenta que la población de CNC estudiada no se vacuna frente a Mh, de manera que la inmunidad detectada en estos animales es debida a la presencia del agente patógeno. En estas explotaciones es frecuente realizar reposición interna, de manera que los animales de cebo pasarían a la reposición (animales de recría) y en la medida que la presión de infección no disminuya en la explotación continuaría en el ciclo con prevalencias detectadas en la fase reproductiva.

Por su parte, sólo se encontraron ***Acs frente a PRRSv***, en un ***3% de los reproductores***. Un resultado negativo en un ELISA puede tener numerosas interpretaciones: cerdos no infectados, recientemente infectados y que aún no han desarrollado inmunidad, animales con infección persistente pero que se vuelven seronegativos, que han superado la infección y ya no presentan Acs, o resultados negativos debido a una baja sensibilidad del test (Yoon y cols., 2003). Los Acs frente a PRRSv pueden ser detectados desde el día 9 post-infección, alcanzando un pico entre los 30-50 dpi, para luego disminuir hasta presentar niveles negativos a los 4-12 meses post-infección (Zimmerman y cols., 2012). Según las especificaciones del fabricante del test de ELISA comercial empleado en este estudio, el ensayo habría permitido detectar Acs desde el día 7 post-infección detectando ratios elevados de animales positivos en estadíos tardíos de la infección (después del día 84 post-infección). De manera que la no detección

de Acs en lechones y animales de cebo, así como la baja seroprevalencia observada en los reproductores, podría interpretarse como una muy baja o casi inexistente presión infectiva de PRRSv en las explotaciones de CNC analizadas en el presente estudio.

Por último, en el presente trabajo se detectaron ***Acs frente a PCV2*** en el ***20% de los lechones***. Numerosos estudios han reportado la presencia de Acs maternales hasta los 21 días de edad, descendiendo hasta desaparecer entre los 49-77 días (Allan y cols., 1994; Rodríguez-Arrioja y cols., 2002; Larochelle y cols., 2003; Opriessnig y cols., 2010). En lechones menores de 4 semanas no es frecuente observar enfermedad clínica sistémica asociada a PCV2 (PMWS) (Segalés y Domingo 2002), lo que sugiere que los niveles de Acs maternales pueden conferir una cierta protección frente al desarrollo de la enfermedad (Allan y cols., 2002; Calsamiglia y cols., 2007; Grau-Roma y cols., 2009). En infecciones experimentales, los lechones privados de calostro fueron más susceptibles a desarrollar enfermedades sistémicas asociadas a PCV2 (Tomás y cols., 2008).

Además, se detectó la presencia de ***Acs de tipo IgM*** en un ***12% de los lechones***, lo que confirma; la circulación de PCV2 en las explotaciones, provocando infección activa o reciente en los lechones analizados, que ha sido descrita en trabajos de inoculación experimental a los 21 dpi y entre 20-50dpi, respectivamente (Segalés y cols., 2005b).

Numerosos estudios describen una disminución de los Acs maternales durante la lactancia, seguido de una seroconversión durante el periodo de engorde en condiciones de campo (Blanchard y cols., 2003; Carasova y cols., 2007; Grau-Roma y cols., 2009; Larochelle y cols., 2003; Rodríguez-Arrioja y cols., 2002), y en trabajos de inoculaciones experimentales la inmunidad frente a PCV2 se detecta entre la 2-3 spi (Fort y cols., 2009; Meerts y cols., 2005; Pogranichniy y cols., 2000; Resendes y cols., 2004; Steiner y cols., 2009).

Este hecho se ve reflejado en la elevada seroconversión detectada en los ***animales de cebo (72%)*** analizados en la población de CNC. Por otro lado, la baja detección de Acs IgM observada en estos (4%), hace que la inmunidad se mantenga estable en la población, hasta que alcanzan la edad reproductiva (***71%*** observada en ***reproductores***). Algunos trabajos describen que esta seroconversión frente a PCV2 puede ocurrir tanto en explotaciones con infecciones subclínicas como en explotaciones con enfermedades sistémicas asociadas al virus (Rodríguez-Arrioja y cols., 2002; Larochelle y cols., 2003; Grau-Roma y cols., 2009). Por lo que la elevada seroprevalencia de PCV2 detectada en la población de CNC no tendría, necesariamente, por qué verse traducida en una mayor presentación de enfermedades asociadas a este virus.

5.2.3 SEROLOGÍA LONGITUDINAL EN GRAN CANARIA

En el presente trabajo, se realizó una segunda serología (2-4 meses después de la primera) en 31 reproductores. Se compararon los resultados obtenidos en ambos análisis y se observó una ***disminución*** considerable en el porcentaje de animales que presentaron ***Acs frente a Mh***, pasando de un 42% de animales positivos a un 19% en la segunda serología, lo que podría interpretarse como una disminución de la presión infectiva de Mh en la población estudiada. Sin embargo, al analizar la dinámica de los Acs en estos animales, se observó que, de los animales que no mostraban inmunidad frente a Mh en la primera serología, un 22% presentó Acs en la segunda, poniendo en evidencia de circulación de este agente patógeno en las explotaciones inspeccionadas.

En ocasiones, cuando se evalúa la presencia de Acs en poblaciones, se puede estar subestimando la verdadera prevalencia de las infecciones, por ello al estudiar la dinámica de las infecciones, es conveniente también evaluar la carga bacteriana presente en las explotaciones mediante otros métodos diagnósticos (Fablet y cols., 2011). Sin embargo, en condiciones de campo, la detección de Acs frente a Mh, siempre es indicativa de infección en aquellas explotaciones donde no se vacuna. Algunos autores referencian la detección de animales seropositivos frente a Mh, en explotaciones donde no ha sido posible detectar al agente patógeno mediante otras técnicas diagnósticas y sugieren una baja presión infectiva en estas explotaciones (Fablet y cols., 2011).

En el caso de ***PCV2,*** se observó ***un ligero incremento*** en el número de animales con Acs de tipo IgG, no detectándose Acs de tipo IgM, de manera que, se trataría de una infección tardía, produciéndose un escaso contacto entre el agente infeccioso y animales adultos (Segalés y cols., 2005b). Como se ha comentado anteriormente, en condiciones de campo los procesos de infección por PCV2, el desarrollo de Acs frente a este y, en consecuencia, el aumento de la seroprevalencia detectada, tiene lugar en los animales de engorde, (Rodríguez-Arrioja y cols., 2002; Blanchard y cols., 2003; Larochelle y cols., 2003; Carasova y cols., 2007; Grau-Roma y cols., 2009), lo que explicaría por tanto que la inmunidad en los reproductores de CNC se mantuviera estable.

Finalmente, la baja inmunidad observada en la primera serología frente a ***PRRSv, no se detectó*** en la segunda. Este hecho reafirmaría aún más la idea de que este agente patógeno ejerce una presión infectiva muy baja, en la población de CNC presente en Gran Canaria, al menos en las explotaciones estudiadas.

5.2.4 COINFECCIÓN ENTRE LOS DISTINTOS AGENTES PATÓGENOS EN EL ARCHIPIÉLAGO CANARIO

En los estudios de campo realizados en explotaciones de cerdo híbrido, se han referenciado frecuentemente, procesos de coinfección entre los agentes etiológicos involucrados en el desarrollo del PRDC. Así, se ha descrito coinfección entre Mh y PCV2 (Opriessnig y cols., 2004), Mh, PCV2 y SIv (Dorr y cols., 2007), entre PCV2 y TTv (Ellis y cols., 2008) y/o entre PRRSv y agentes bacterianos como *B. bronchiseptica* o *P. multocida* (Brockmeier y cols., 2001).

En la población de CNC, se evaluó la presencia de Acs frente a varios agentes patógenos respiratorios, en 35 explotaciones del Archipiélago Canario, y se observó que en el ***51%*** de ellas se identificaron ***Acs frente a dos o los tres patógenos analizados***. La coinfección entre Mh y los agentes víricos se hizo evidente en un elevado número de explotaciones (48%), siendo más frecuente la detección de ***Acs frente a Mh, PCV2 y PRRSv (25%)***, seguida por ***Mh y PCV2 (20%)***. Solo fue posible observar coinfección entre ***Mh y PRRSv*** en una explotación ***(3%)***. Estos resultados coinciden con algunos autores, que le confieren a Mh un papel importante en la patogénesis del PRDC (Thacker, 2006; Sibila y cols., 2009), propuesta reforzada por Hansen y cols., (2010c), y además identifican otros agentes patógenos, entre ellos PCV2 y PRRSv, en el desarrollo del PRDC, siendo Mh significativamente frecuente en los casos de bronconeumonía.

Estas coinfecciones también han sido descritas recientemente en animales salvajes, detectándose Mh y PRRSv en Grecia, (Marinou y cols., 2015); así como, Mh, PRRSv y PCV2 en Estados Unidos y España (Baker y cols., 2011; Closa-Sebastià y cols., 2011). Tanto en el continente americano como en algunos países europeos (Alemania, Croacia y España), también se ha referenciado la coinfección solo entre PRRSv y PCV2 (Corn y cols., 2009; Reiner y cols., 2010; Boadella y cols., 2012;

Hammer y cols., 2012; Roic y cols., 2012; Baroch y cols., 2015; Stephenson y cols., 2015). En todos los estudios mencionados anteriormente, la seroprevalencia detectada para PCV2 fue mayor que la detectada para Mhy la seroprevalencia frente a PRRSv, siempre fue muy baja; datos que se corresponden con los observados y discutidos en la población de CNC estudiada.

Por todo lo anteriormente mencionado, queda claramente reflejada la circulación de Mh, PRRSv y PCV2 en las explotaciones de CNC distribuidas por el Archipiélago Canario, presentándose coinfecciones en muchos casos. Esto supone un factor de riesgo importante, siendo posible la presentación clínica de PRDC en esta raza, si las condiciones de manejo o medioambientales contribuyeran a ello, puesto que también desempeñan un importante papel en el carácter multifactorial del PRDC.

5.2.5 USO DE EXTRACTOS DE TEJIDO PULMONAR EN TÉCNICAS DE ELISA

Para conocer el estado sanitario de una población, con frecuencia se realizan análisis serológicos a partir de muestras de sangre tomadas en la explotación, aunque también se pueden emplear muestras de sangre tomadas en matadero en el momento del sacrificio de los animales (Sorensen y cols., 2006).

Además del suero sanguíneo, otras muestras obtenidas de animales vivos pueden ser objeto de su estudio, tales como: secreción nasal, hisopos traqueales, lavados traqueobronquiales o calostro (Bochev, 2008). El uso de saliva se viene empleado desde hace algunos años para la detección de los patógenos involucrados en el desarrollo del PRDC, entre los que cabría destacar la detección de PRRSv, PCV2 o TTv mediante PCR (Prickett y cols., 2008a, 2011; Ramírez y cols., 2012). También se han empleado técnicas de ELISA para la detección de Acs frente a App o PRRSv en saliva (Loftager y cols., 1993; Prickett y cols., 2008b; Kittawornrat y cols., 2012, 2014). Los Acs presentes en la saliva pueden ser producidos en tejidos linfoides asociados a la mucosa oral, como la tonsila, o pueden alcanzar la mucosa oral desde el sistema circulatorio (Prickett y Zimmermann, 2010).

El jugo de carne o trasudado de músculo ha sido empleado como alternativa al uso del suero para la detección de Acs entre las que cabría destacar *Salmonella*, Aujezsky's disease virus, *Trichinella spiralis* y PRRSv (Czerny y cols., 2001; Mortensen y cols., 2001; De Lange y cols., 2003; Beck y cols., 2005), aunque para *Salmonella* algunos autores describen discrepancias entre los valores obtenidos en jugo de carne, al compararlos con los de suero (Vico y Mainar-Jaime, 2011). Recientemente, se ha descrito la detección de Acs frente a PRRSv y PCV2 (Fabisiak y cols., 2013) y frente a *Salmonella* spp., Mh y PRRSv (Meemken y cols., 2014) en jugo de carne, empleando kits de ELISA comerciales.

La serología es una herramienta de gran utilidad para caracterizar el estado sanitario en las poblaciones animales, incluido los animales salvajes. Sin embargo, obtener un número suficiente de sueros de calidad puede suponer un problema. Como alternativa, algunos autores han propuesto el uso del extracto de tejido pulmonar, atendiendo a su buena irrigación, como muestra alternativa para la detección de Acs (Mörner y cols., 1988; Ferroglio y cols., 2000; Jakubek y cols., 2012).

En el presente trabajo se analizaron extractos de tejido pulmonar de 18 animales sacrificados en matadero empleando kits de ELISA comerciales para la detección de Acs frente a Mh, PRRSv y PCV2. Si bien estos kits han sido desarrollados para la detección de Acs en suero sanguíneo de porcino, algunos autores han descrito la detección de Acs frente a PCV2 en muestras de jugo de carne, obteniendo buenos resultados (Fabisiak y cols., 2013).

Por otro lado, Díaz y cols., (2013), han estimado la sensibilidad y especificidad del uso de los extractos de tejido pulmonar, para la detección de Acs frente a Mh, con el kit comercial de ELISA utilizado en el presente trabajo. Se analizaron muestras pulmonares de porcinos, procedentes de matadero, que presentaban lesiones neumónicas compatibles con infección por Mh e IHQ +. La IHQ se definió como *"gold standar"* en ese estudio, observándose una sensibilidad del 73% y una especificidad del 100% para el uso de los extractos de tejido pulmonar, y del 93% y 100%, respectivamente para el suero sanguíneo. Estos resultados sugieren que los extractos pulmonares pueden ser una alternativa cuando existen dificultades en la toma de muestras sanguínea (Díaz y cols., 2013).

Los resultados obtenidos para las muestras de suero sanguíneo y extracto de tejido pulmonar de CNC fueron analizados estadísticamente. Se estimó que la ***concordancia*** entre ambas muestras fue ***buena en los test de ELISA realizados frente a PRRSv*** (Kappa 0,640) ***y PCV2*** (IgG) (Kappa 0,640). Para la detección de Acs frente a Mh y Acs de tipo IgM frente a PCV2 no se pudo calcular ningún estadístico puesto que la serología en los extractos pulmonares y suero sanguíneo fue negativa. De manera que haría falta realizar más estudios con animales que presentaran Acs frente a Mh e infección activa o reciente de PCV2 para poder evaluar la concordancia entre ambos tipos de muestras.

Además, en este trabajo se estimó, para todos los test de ELISA realizados (Mh, PRRSv y PCV2 IgG/IgM) una correlación lineal positiva entre los Acs detectados en ambas muestras. Se observó una ***muy buena correlación*** entre los ***Acs de tipo IgG frente a PCV2*** detectados en ambas muestras y una ***buena correlación*** entre los ***Acs detectados frente a PRRSv*** en ambas muestras. Para la detección de Acs frente a Mh y Acs de tipo IgM frente a PCV2 la correlación fue de baja a moderada, puesto que se trataba de animales sin inmunidad o seronegativos.

En numerosos trabajos realizados en animales salvajes también se ha encontrado una buena correlación entre los Acs detectados en suero y extracto de tejido pulmonar frente a numerosos patógenos. Así, Mörner y cols., realizaron en 1988 un estudio comparativo entre los Acs frente a *Francisella tularensis biovar paleártica* detectados en suero y extractos de azores (*Accipiter gentilis*) y castores europeos (*Castor fiber*) infectados experimentalmente y en muestras de 110 castores salvajes describiendo una buena correlación entre los Acs detectados en ambas muestras. Ferroglio y cols., en el año 2000, también observaron una buena correlación entre la positividad del suero y del extracto de tejido pulmonar al comparar la detección de Acs frente a *Brucella abortus* en suero sanguíneo y extracto de tejido pulmonar en animales salvajes (rebecos) y domésticos (vacas). Sin embargo, los títulos de Acs en suero observado por estos autores fueron tres veces mayor que en los extractos. Este hecho coincide con los resultados obtenidos por Díaz y cols. (2013), que, aunque describen una buena sensibilidad en la detección de Acs frente a Mh en extractos pulmonares, ésta fue menor que la observada al analizar suero sanguíneo.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo descrito por otros autores y el extracto de tejido pulmonar podría ser una buena alternativa en la realización de técnicas de ELISA para la detección de Acs frente a PCV2 y PRRSv, y aunque para la detección de Acs frente a Mh se ha descrito una buena sensibilidad y especificidad en trabajos previos, haría falta realizar más estudios con animales positivos para poder estimar la concordancia y el coeficiente de correlación para los Acs detectados en ambas muestras.

5.3 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO EN ANIMALES SACRIFICADOS EN MATADERO

5.3.1 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO EN PULMÓN

5.3.1.1 HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

La inspección de los cerdos en el matadero se viene usando durante décadas en numerosos estudios epidemiológicos del PRDC, para determinar la prevalencia de las lesiones pulmonares de enfermedades respiratorias clínicas y subclínicas (Sibila y cols., 2009).

Con la finalidad de poder evaluar posibles presentaciones subclínicas del PRDC en la raza de CNC, en el presente trabajo, se estudió la prevalencia y severidad de las lesiones pulmonares que pudieran estar presentes en un total de 30 ejemplares (10 lechones, 15 animales de cebo y 5 reproductores). Numerosos estudios proponen este tamaño muestral para poder obtener una estimación fiable de dichos parámetros (Morrison y cols., 1985; Straw y cols., 1989; Davies y cols., 1995). Los estudios de prevalencia de lesiones pulmonares, como las bronconeumonías supurativas asociadas a infección por Mh, referenciados en animales sacrificados en matadero, se limitan a la identificación de lesiones crónicas al final del ciclo productivo (Thacker y Minion, 2012). Por lo general, la progresión de las lesiones neumónicas observadas en éstos va a depender, fundamentalmente, del tipo de neumonía involucrada, no detectándose con frecuencia en matadero aquellas lesiones macroscópicas debidas a infecciones por Mh que cursan en edades tempranas (Noyes y cols., 1988; Wallgren y cols., 1994).

Además, las lesiones asociadas a Mh, podrían verse enmascaradas por otras lesiones, como las pleuritis producidas en casos de infección por otros agentes bacterianos como App, y que afecta a los animales al final de ciclo productivo (Jirawattanapong y cols., 2010). Esta situación podría llevar a subestimar las lesiones causadas por Mh, debido a la obtención de resultados falsos-negativos (Sorensen y cols., 1997). Por lo expuesto, en el presente trabajo se analizaron animales de distintas edades, obteniendo así mayor información sobre la prevalencia de las lesiones pulmonares en las diferentes categorías. Además, se tomaron muestras para su posterior estudio histopatológico, lo que nos permitió detectar lesiones microscópicas en pulmones aparentemente sanos.

Los estudios en matadero, se basan en una exhaustiva inspección visual y palpación de los pulmones, y el porcentaje de neumonías se determina, con frecuencia, a partir del porcentaje de pulmones que presentan variación en la consistencia (firme) y color (pálido grisáceo) de su parénquima (Mousing y Christensen 1993; Sorensen y cols., 2006; Bollo y cols., 2008; Thacker y cols., 1999, 2010).

En el presente estudio fue posible observar la presencia de ***lesiones macroscópicas en un 10%*** de los pulmones evaluados, tratándose en los 3 casos de animales de cebo. Estas lesiones afectaban a los lóbulos craneales y/o medio, y se caracterizaban por la presencia de áreas de consolidación craneoventral, deprimidas, comprometiendo a los lobulillos, de coloración rojo oscuro a gris y extensión discreta, correspondiéndose con ***bronconeumonía supurativa***. Este patrón ha sido descrito por numerosos autores, asociado a infección por Mh (Lium y Falk, 1991; Strasser y cols., 1992; Dungworth, 1993; Sorensen y cols., 1997).

El porcentaje de pulmones con lesiones de bronconeumonía supurativa, observado en el CNC, es muy inferior al descrito en numerosos trabajos realizados en cerdos híbridos donde la prevalencia de las lesiones neumónicas en los animales sacrificados en mataderos se aproxima al 58% (Brockmeier y cols., 2002). La recopilación bibliográfica de estudios realizados en diferentes países ponen en evidencia las variaciones de los resultados. Así, por ejemplo, en Italia se observó lesiones de bronconeumonía supurativa en un 46,4-59,6% de los animales, en Bélgica, se describen prevalencias próximas al 24% y en Francia en torno al 70% (Ostanello y cols., 2007; Meyns y cols., 2011; Fablet y cols., 2012a; Merialdi y cols., 2012). En España, algunos autores han descrito la presencia de lesiones macroscópicas asociadas a Mh entre un 53,5 – 55,7% de los animales sacrificados en matadero (Fano y cols., 2007; Fraile y cols., 2010).

En el PRDC, estas lesiones pueden estar acompañadas por pleuritis, la cual se describe en un 21-50% de los pulmones evaluados (Fraile y cols., 2010; Jirawattanopong y cols., 2010; Meyns y cols., 2011; Merialdi y cols., 2012; Neumann y cols., 2014). Las infecciones por *H. parasuis, Strep. suis* y *M. hyorhinis* tienen asociadas pleuritis primarias, mientras que las pleuritis secundarias o paraneumónicas están asociadas normalmente a procesos de neumonía causados por App o Mh (Jirawattanopong y cols., 2010). En un estudio del PRDC, no publicado, realizado en una explotación de híbridos en Gran Canaria, se describió una prevalencia de pleuritis en un 16% y de bronconeumonía fibrinosupurativa compatibles con infecciones por App en un 6% de los animales sacrificados en matadero (Paz-Sánchez, 2011). Sin embargo, en el CNC únicamente se observaron lesiones de bronconeumonía supurativa sin otros patrones morfológicos asociados.

La baja presencia de lesiones neumónicas detectada en el presente estudio podría deberse a que las condiciones medioambientales y de manejo, así como el sistema de producción descrito para esta raza difieren mucho de la producción intensiva del cerdo híbrido. Diversos trabajos hacen especial hincapié en el papel que desempeñan determinados factores de riesgo, en el desarrollo de infecciones por Mh y del PRDC, incluyendo el tamaño de las explotaciones, sistema de producción, la densidad de la población porcina en áreas específicas, el movimiento de los animales, las medidas de higiene y los programas de vacunación frente a Mh (Stärk y cols., 1992; Bilkei, 1996; Docic y Bilkei, 2001; Brockmeier y cols., 2002; Ostanello y cols., 2007; Vangroenweghe y cols., 2015). Se han descrito prevalencias de lesiones neumónicas debidas a Mh significativamente menores en explotaciones al aire libre (16%), que las observadas en intensivo (30%) (Docic y Bilkei, 2001; Bilic y Bilkei, 2006).

Vicente y cols., en 2006, así como recientemente Risco y cols., (2015), realizaron estudios en jabalíes, donde se analizaron las lesiones y los agentes etiológicos asociados al PRDC; sin embargo, en estos trabajos no se describe la prevalencia y severidad de los hallazgos macroscópicos y se centran en el estudio de las lesiones histopatológicas. Estos autores argumentan, que al tratarse de animales sacrificados durante las cacerías, los pulmones presentan con frecuencia hemorragias que podrían enmascarar al resto de lesiones, dando una interpretación errónea de las mismas (Risco y cols., 2015). Sin embargo, Sibila y cols., (2010), reportaron, en un estudio epidemiológico de Mh, en 428 jabalíes sacrificados en cacerías durante 2000-2008 en España, que ninguno de los animales presentó lesiones de bronconeumonía supurativa asociadas a Mh. De manera que no ha sido posible comparar la prevalencia de las lesiones macroscópicas observadas en el CNC con datos referidos a animales con condiciones ambientales o de manejo más parecidas a las de esta raza.

5.3.1.2 HALLAZGOS MICROSCÓPICOS

En el presente trabajo se realizó estudio histopatológico a nivel pulmonar en todos los animales (con y sin lesiones macroscópicas), analizando su prevalencia y severidad según la edad de los animales. Se obtuvieron entre 3 y 4 muestras del parénquima pulmonar de distintos lóbulos, teniendo en cuenta que la colonización del epitelio por parte de Mh es segmental (Thacker y Minion, 2012). El muestreo fue dirigido, tomando muestras siempre del parénquima afectado. En aquellos casos en donde no se observaron lesiones macroscópicas, se muestreó el pulmón derecho, ya que al poseer una mayor distribución broncogénica, es colonizado antes por aquellos patógenos que entran vía aerógena y siempre resulta más comprometido (Mousing y Christensen, 1993; Maes y cols., 1996; Sorensen y cols., 1997; Andrada, 2001).

En el CNC se observó un elevado porcentaje de animales (100%) con algún tipo de lesiones histopatológicas a nivel pulmonar, coincidiendo con lo descrito en animales salvajes en España (Risco y cols., 2015). Sin embargo, tanto en jabalíes como en el CNC, estos hallazgos no se correspondieron en todos los casos con lesiones de tipo inflamatorias, ni presentaron la misma severidad en todos los animales inspeccionados. Escasos trabajos, realizados en cerdos híbridos, han realizado también estudio histopatológico de las lesiones macroscópicas detectadas en matadero (Ostanello y cols., 2007; Hansen y cols., 2010c).

Uno de los procesos inflamatorios observado en el CNC fue la ***neumonía broncointersticial (47%),*** caracterizada por la presencia de exudado inflamatorio de tipo polimorfonuclear neutrofílico en vías aéreas y/o luz alveolar, y engrosamiento de las paredes alveolares por la proliferación de neumocitos tipo II y exudado de tipo mononuclear en luz alveolar. Estas lesiones han sido descritas en híbridos asociada a infección por Mh y como una de las lesiones más frecuentemente observada en el PRDC (Dungworth y cols., 1993; Sorensen y cols., 1997; Brockmeier y cols., 2002; Hansen y cols., 2010c).

En España se ha descrito la presencia de neumonía broncointersticial en animales salvajes, observando entre el 14-29% de los pulmones afectados (Vicente y cols., 2004; Sibila y cols., 2010; Risco y cols., 2015). Estos datos difieren de los observados en el CNC, donde el porcentaje total de animales con estas lesiones fue muy superior. Estas discrepancias entre los resultados obtenidos en el CNC y los publicados en el jabalí, podrían deberse a que, si bien las condiciones ambientales en las que se desarrollan ambos grupos son parecidas (al aire libre, con baja o muy baja densidad de animales, entre otros), éstas no son exactamente iguales ya que, los jabalíes analizados en estos estudio eran de vida libre y no criados en explotaciones, como si lo es el CNC, donde, algunas condiciones de manejo podrían estar favoreciendo un mayor desarrollo de lesiones pulmonares a nivel microscópico.

En cuanto a la severidad de las lesiones observadas en el CNC, fue más frecuente la presencia de lesiones de neumonía broncointersticial moderada (30%) que leve (17%). Esta diferencia fue menor (moderada 7%; leve 6%) en la población de jabalíes estudiada por Risco y cols., (2015), observándose en este caso también lesiones severas (2%). Además, las lesiones de neumonía broncointersticial se observaron más frecuentemente en lechones de CNC que en los animales de cebo, de acuerdo con lo descrito por otros autores en el jabalí, donde esta diferencia es estadísticamente significativa (Risco y cols., 2015).

Otro hallazgo histopatológico observado en el CNC fue la presencia de hiperplasia del BALT, de severidad variable, caracterizada inicialmente por un infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario peribronquial o peribronquiolar hasta una severa proliferación de folículos linfoides, llegando a ocluir la luz de las vías aéreas. Estas lesiones microscópicas han sido descritas por numerosos autores asociada a casos de infección por Mh y al PRCD (Livingston y cols., 1972; Morris y cols., 1995; Ross, 1999; Calsamiglia y cols., 2000; Brockmeier y cols., 2002; Harms y cols., 2002; Hansen y cols., 2010c).

La ***hiperplasia del BALT*** se observó con severidad variable en el ***77%*** de los animales (40% leve, 30% moderada y 7% severa). Esta prevalencia es similar a la descrita en el jabalí (63%) (Risco y cols., 2015); si bien, otros autores han referenciado una prevalencia menor (32%) (Vicente y cols., 2004). Tanto en el CNC, como en la población de jabalíes estudiada por Risco y cols., se observó una mayor presencia de lesiones leve a moderada (23%, en ambos casos en los jabalíes), frente a un 8% de animales con hiperplasia severa. Por otro lado, en el CNC se vieron más afectados los ***lechones (80%)***, seguidos por los ***animales de cebo (73%)***, mientras que en el jabalí la categoría que se vio más afectada fue esta última, mostrado una diferencia estadísticamente significativa (Risco y cols., 2015). Además, los reproductores de CNC también presentaron este tipo de lesión en un alto porcentaje (80%), si bien el número de animales evaluados podría haber sido insuficiente.

A partir de un estudio experimental, Livingston y cols., en 1972 proponen una clasificación semicuatitativa de las lesiones microscópicas de neumonía broncointersticial con hiperplasia del BALT, observadas en animales inoculados con Mh. Las lesiones descritas a los 10 dpi fueron clasificadas como **grado I** y estuvieron caracterizadas por infiltrado linfocítico y/o leve hiperplasia del BALT en submucosa, sin afectar a la capa muscular de los bronquios y acompañado de leve exudado inflamatorio en luz bronquial o bronquiolar. A los 14 dpi, en las de **grado II**, describieron un aumento del infiltrado inflamatorio peribronquial e hiperplasia de BALT, afectando a la capa muscular de la mucosa y exudado inflamatorio moderado en vías aéreas, pudiendo presentar un leve engrosamiento de las paredes alveolares con infiltrado inflamatorio mononuclear. A los 37 dpi, las de **grado III**, estuvieron caracterizadas por un moderado-severo exudado inflamatorio mixto con predominio de polimorfonucleares en vías aéreas y alveolos, e hiperplasia del BALT moderada. Finalmente a los 42 dpi, las de **grado IV** estuvieron representadas en áreas extensas del parénquima pulmonar con severa hiperplasia del BALT, llegando a ocluir las luces de las vías aéreas.

En un trabajo realizado en el año 2000, Calsamiglia y cols., clasificaron las lesiones de neumonía broncointersticial compatibles con infección por Mh basándose en una modificación de los grados lesionales propuestos por Livingston y cols., (1972). Otro método ha sido descrito por Ross, en 1999, y empleado por otros autores para cuantificar las lesiones microscópicas de hiperplasia del BALT, observadas en casos de infección natural (Hansen y cols., 2010c). La clasificación propuesta por Livingston y cols., ha sido utilizada en algunos trabajos realizados en cerdo híbrido en Gran Canaria, en casos de inoculación experimental e infección natural por Mh o con PRDC (Andrada, 2001; Sarradell y cols., 2003; Lorenzo y cols., 2006; Paz-Sánchez, 2011).

En el presente estudio, también se empleo este método para clasificar las lesiones de neumonía broncointersticial con hiperplasia del BALT en animales sacrificados en matadero a distintas edades. En el 47% de los animales inspeccionados, se observó algún grado de neumonía broncointersticial compatible con Mh, de los cuales solamente un 10% presentaba lesiones macroscópicas de bronconeumonía supurativa. Estos resultados sugieren la necesidad de evaluar también pulmones sanos cuando se intenta estimar la prevalencia de lesiones asociadas a Mh.

Así, se observaron lesiones de ***neumonía broncointersticial*** de ***grado I en un 24%*** de los animales y de ***grado II un 13%.*** Sólo el ***3%*** de las lesiones fueron clasificadas como ***grado III*** y un ***7%*** como ***grado IV***. La mayor presencia de lesiones de neumonía broncointersticial de grado I y II en estos animales indicarían la circulación de Mh en las explotaciones de CNC, observándose hallazgos histopatológicos que sugieren el desarrollo de infecciones recientes, según describe Livingston y cols., a los 10-14 dpi.

Estas lesiones se observaron en un ***60% de los lechones*** y un ***54% de los animales de cebo***, no detectándose en los reproductores, lo que estaría indicando una mayor susceptibilidad de los animales jóvenes para desarrollar neumonía broncointersticial. Estos resultados coinciden con algunos autores, que describen en condiciones naturales, a los cerdos en edad de crecimiento y engorde como las categorías más afectadas, dependiendo del estado inmune del animal y de las condiciones de manejo (Sibila y cols., 2007; Thacker y Minion, 2012). Las primeras manifestaciones clínicas debidas a infección por Mh se observan en lechones a partir de las 4 semanas de edad, cuando ya han perdido la inmunidad materna (Kobisch y Friis, 1996).

En el presente trabajo, los ***lechones*** presentaron únicamente lesiones de ***grado I y II***, predominando las de grado I. En los ***animales de cebo***, también se observó una mayor prevalencia de las lesiones de ***grado I***, seguidas de las de ***grado II***, y en menor proporción, lesiones de ***grado III y IV***. En determinadas condiciones de manejo la presentación de la enfermedad puede retrasarse hasta las 12-20 semanas de edad y afectar principalmente a animales de cebo (Maes y cols., 1996). Cuando la infección por Mh tiene lugar en una explotación libre de NEP, pueden verse afectadas todas las categorías (Kobisch y Friis, 1996; Sibila y cols., 2007).

De los resultados obtenidos se deduce que la infección por Mh en el CNC podría producirse desde edades tempranas y que las lesiones terminan resolviéndose en la fase final del ciclo productivo (bajo porcentaje de lesiones de grado III y IV), llegando a desaparecer por completo en los reproductores. Sin embargo, parece haber circulación de Mh también entre los animales de cebo encontrándose lesiones asociadas a infecciones recientes (grados I y II) (Livingston y cols., 1972).

Otro patrón morfológico microscópico de inflamación descrito en el CNC fue la **neumonía intersticial**. Este tipo de lesiones son compatibles con infecciones por agentes víricos como PCV2 o PRRSv y también se describen en los procesos de PRDC (Rossow y cols., 1995; Clark, 1997; Rossow, 1998; Rosell y cols., 1999; Brockmeier y cols., 2002; Harms y cols., 2002; Segalés y Domingo, 2002). Estas lesiones estuvieron caracterizadas por engrosamiento de las paredes alveolares con presencia de infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario e hiperplasia de neumocitos tipo II, acompañadas en algunos casos por exudado inflamatorio mononuclear, con macrófagos alveolares espumosos y células gigantes multinucleadas (sincitios) en luz alveolar.

La presencia de ***neumonía intersticial*** se observó en un ***67%*** de los animales inspeccionados siendo más frecuente las lesiones leves o moderadas (37-30%) que las severas. Esta prevalencia fue superior al 46% descrito en jabalíes, en donde también se observó una mayor proporción de lesiones leves (29%) que moderadas (16%) y un menor porcentaje de animales con lesiones severas (1%), aunque no describieron diferencias significativas entre los animales de las distintas categorías (Risco y cols., 2015).

Las coinfecciones entre Mh y otros patógenos virales son muy frecuentes en el PRDC (Brockmeier y cols., 2002; Thacker y Thanawongnuwech, 2002; Bochev, 2007; Hansen y cols., 2010c), observándose lesiones combinadas de neumonía broncointersticial asociadas a Mh y procesos de neumonía intersticial asociadas a la infección por virus. En estudios experimentales, al inocular Mh conjuntamente con PRRSv o PCV2, se potencia la severidad de las lesiones producidas (Thacker y cols., 1999; Opriessnig y cols., 2004). En el presente trabajo fue posible observar ***lesiones combinadas de neumonía broncointersticial y neumonía intersticial*** en un ***37%*** de los animales inspeccionados. El desarrollo de estas lesiones microscópicas de manera conjunta, sugiere la posible existencia de coinfecciones entre distintos patógenos respiratorios, en los ejemplares de CNC inspeccionados.

5.3.2 DETECCIÓN DE MH, PRRSV Y PCV2 MEDIANTE IHQ EN TEJIDO PULMONAR

Para llegar a un diagnóstico definitivo de PRDC es necesario realizar estudios laboratoriales complementarios que nos permitan identificar a los agentes involucrados (Bochev, 2008). Debemos destacar el diagnóstico de Mh, PCV2 y/o PRRSv, teniendo en cuenta que los distintos patrones morfológicos observados (neumonía broncointersticial y neumonía intersticial) en el CNC, se pueden atribuir a infecciones por estos agentes etiológicos (Thacker, 2004; Segalés, 2012; Zimmerman y cols., 2012).

La IHQ es un método de diagnóstico directo, rápido, relativamente barato y que por lo general, presenta una buena sensibilidad y especificidad. Numerosos trabajos describen esta técnica como la más frecuentemente empleada para la detección de Ags de Mh en tejido pulmonar (Amanfu y cols., 1984; Andrada, 2001; Sarradell y cols., 2003; Opriessnig y cols., 2004; Lorenzo y cols., 2006). También permite identificar Ags de PRRSv en muestras de pulmón y en otros órganos como tonsila, linfonodos, bazo, timo, corazón, riñón, hígado y digestivo (Magar y cols., 1993; Halbur y cols., 1994; Rossow y cols., 1996a; Van Alstine y cols., 2002; Yaeger 2002; Quezada y cols., 2004). En estos tejidos también es posible detectar Ags de PCV2, siendo los linfonodos (mesentéricos; inguinal superficial, mediastínicos, entre otros) las muestras de elección (McNeilly y cols., 1999; Rosell y cols., 1999; Chianini y cols., 2003; Staebler y cols., 2005; Grau-Roma y cols., 2012; Segalés, 2012; Gjurovski y cols., 2015; Quesada-Canales, 2015). Otras técnicas, como la ISH también han dado buenos resultados en la detección de estos agentes etiológicos (Larochelle y cols., 1996; Kwon y Chae 1999; McNeilly y cols., 1999; Rosell y cols., 1999; Segalés, 2012).

En el presente trabajo, se empleo la IHQ para la detección de Ags de Mh, PRRSv y PCV2 en tejido pulmonar utilizando Acs, policlonal frente a Mh y monoclonales frente a PCV2 y PRRSv, descritos o estandarizados en estudios previos, (Andrada 2001; Sarradell y cols., 2003; Lorenzo y cols., 2006; Quesada-Canales, 2015).

5.3.2.1 DETECCIÓN DE MH.

Aunque el cultivo es considerado la técnica de referencia en la identificación de Mh, no se emplea en el diagnóstico rutinario. Es más frecuente, la realización de técnicas de IHQ o ISH para la detección de este agente tanto en animales inoculados experimentalmente, como en aquellos con infección natural (Kwon y cols., 1999, 2002; Andrada, 2001; Sarradell y cols., 2003; Rodríguez y cols., 2004; Lorenzo y cols., 2006; Redondo y cols., 2006).

En el tejido pulmonar de ejemplares de CNC, se observó ***inmunorreacción*** granular en la superficie del epitelio respiratorio de bronquios y bronquiolos, en el ***50% de los animales inspeccionados***. Esta localización, ha sido descrita previamente por numerosos autores en razas híbridas asociada a lesiones microscópicas de neumonía broncointersticial (Andrada, 2001; Sarradell y cols., 2003; Opriessnig y cols., 2004; Lorenzo y cols., 2006; Sibila y cols., 2009). Otros autores han detectado Mh mediante ISH en muestras de jabalíes en la misma localización, aunque su detección fue mucho menor (15%) que la descrita para el CNC (Risco y cols., 2015).

En el presente trabajo, se observó esta inmunorreacción con mayor frecuencia en los ***lechones (60%)*** y en menor medida en los ***animales de cebo (47%)*** y en ***reproductores (40%)***. Además, se detectó en el 57% de los animales que presentaban neumonía broncointersticial y el 44% de los que no expresaron este patrón lesional. En función de la clasificación propuesta por Livingston y cols., fue posible la detección de Mh en el 86% de los pulmones con lesiones grado I, disminuyendo en los grados más crónicos. En los lechones se observó inmunorreacción con la misma frecuencia en pulmones con lesiones de grado I y sin lesiones de neumonía broncointersticial (75%). En los animales de cebo, se detectó Mh en todas las lesiones de grado I (100%) y en un 50% de las lesiones de grado II, así como en un 29% de pulmones sin lesiones de neumonía broncointersticial. En los reproductores no fue posible detectar Ags de Mh.

Por un lado, esta mayor detección de Mh en lechones podría sugerir un mayor contacto e infección en edades tempranas, y por otro, la detección de Mh, mediante IHQ, en animales que no presentaban lesiones de neumonía broncointersticial podría deberse a infecciones recientes, tal y como referencian algunos autores, que describen una mayor detección de Mh en fases iniciales de NEP, que va disminuyendo a medida que evoluciona la enfermedad (Kobish y cols., 1996; Ross y cols., 1999). Sin embargo, otros autores han descrito una elevada detección de Mh en todos los animales inoculados, hasta la semana 5 pi. (Lorenzo y cols., 2006).

5.3.2.2 DETECCIÓN DE PRRSV Y PCV2

Igualmente, se realizó IHQ frente a PRRSv y PCV2 en los pulmones de todos los animales incluidos en el estudio. Si bien, un elevado porcentaje de animales presentaba lesiones histopatológicas de neumonía intersticial compatible con infecciones víricas, ***no se detectaron Ags de PRRSv ni PCV2***. Estos hallazgos podrían sugerir la ausencia de estos patógenos, y que las lesiones observadas pudieran deberse a la infección por otros agentes víricos (SIv, PRCv o TTv), septicemias por bacterias gram negativas (*Salmonella spp, H parasuis*) o migraciones severas de formas larvarias de *Ascaris* (Van Alstine y cols., 2012).

Sin embargo, en la detección de PRRSv mediante IHQ, numerosos autores defienden que existe una amplia variedad de factores que pueden influir en la carga viral a nivel pulmonar y en la capacidad de esta técnica para detectarlo. Algunos de estos factores han sido descritos por Wagner y cols., (2011), quienes observaron, en relación con el momento de infección, una mayor carga antigénica de PRRSv en estados iniciales de la infección (mayor detección a los 10 dpi que a los 21). Otros autores referencian una carga viral elevada en los tejidos durante los primeros 30 dpi, descendiendo bruscamente pasado este tiempo (Pol, 1991; López y Osorio, 2004; Lyoo, 2015). La región del pulmón seleccionada para la toma de muestras y su posterior estudio IHQ, también influye en la detección antigénica, describiéndose una mayor identificación de PRRSv en los lóbulos craneales y medios que en los caudales (Halbur y cols., 1996a). Otro factor a tener en cuenta es el número de secciones evaluadas, siendo necesario tomar al

menos 5 muestras en la región craneoventral del pulmón (Yaeger, 2002). Por otra parte, es importante que el tiempo de fijación en formol al 10% de los tejidos no supere las 24 horas. Una fijación durante más de 48 horas podrían reducir o eliminar la detección de Ags de PRRSv mediante IHQ o puede requerir la aplicación de protocolos de recuperación antigénicas adicionales (Van Alstine y cols., 2002).

Estos factores limitantes se tuvieron en cuenta en el protocolo de recogida y conservación de las muestras, respetándose el lugar de muestreo y el tiempo de fijación; si bien, el número de muestras tomadas podría haber sido insuficiente, influyendo negativamente en la detección de Ags de PRRSv. Por otra parte, es posible que la ausencia de inmunorreacción pudiera deberse a una baja carga de este patógeno en los pulmones de CNC inspeccionados en matadero. Algunos autores han descrito la detección de Ags de PRRSv en jabalíes en un 14% de los pulmones evaluados, si bien la intensidad de la inmunorreacción observada fue débil en macrófagos alveolares y presentes en el BALT (Risco y cols., 2015).

Tampoco se detectó Ags de PCV2 en pulmón, en los ejemplares de CNC inspeccionados, resultados que no coinciden con el 54% observado en jabalíes (Risco y cols., 2015). En casos clínicos descritos en híbridos, cuando la carga viral en las fases iniciales de la enfermedad fue elevada, también se ha observado inmunorreacción frente a PCV2 en el pulmón (McNeilly y cols., 1999; Rosell y cols., 1999; Chianini y cols., 2003; Staebler y cols., 2005; Segalés, 2012; Quesada-Canales, 2015; Gjurovski y cols., 2015). Sin embargo, algunos autores referencian una mayor detección en otros tejidos por los que PCV2 tiene tropismo, como el tejido linfoide, observándose en este caso una marcada inmunorreacción (Haruna y cols., 2006). En cuanto a la sensibilidad de la IHQ en comparación con otros métodos de diagnóstico directo, Hansen y cols., (2010c), describieron, una mayor detección de PCV2 a nivel pulmonar por PCR (98%) que mediante la IHQ (14-17%), en un estudio de prevalencia en matadero.

5.3.3 Estudio anatomopatológico complementario (órganos hemolinfoides, hígado y riñón).

Como ya se ha comentado anteriormente, tanto PCV2 como PRRSv, participan en el desarrollo del PRDC, y además pueden causar enfermedades multisistémicas, ejerciendo su acción patógena y desarrollando lesiones en otros órganos.

Las principales lesiones histológicas inducidas por PCV2 se describen en el tejido linfoide (linfonodos, bazo, tonsila, placas de Peyer y timo) y se caracterizan por depleción linfoide generalizada de grado variable y presencia de infiltrado histiocítico con sincitios y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Opriessnig y cols., 2007; Segalés, 2012). El riñón es otro órgano que se ve afectado en las enfermedades multisistémicas asociadas a PCV2, donde es frecuente el desarrollo de nefritis intersticial con un infiltrado inflamatorio que puede variar de linfoplasmocitario a histiocítico con células gigantes multinucleadas (Clark, 1997; Segalés y cols., 2002; Segalés, 2012), llegando a producir también procesos de glomerulonefritis fibrinonecrotizante en la presentación del PDNS (Segalés y cols., 1998; Drolet y cols., 1999; Rosell y cols., 2000b). En hígado, las lesiones inducidas por este virus están representadas por un infiltrado linfohistiocítico periportal o intersticial, desorganización de los cordones hepáticos, vacuolización y necrosis de hepatocitos, cuerpos apoptóticos y fibrosis perilobulillar (Clark, 1997; Harding y Clark, 1997; Rosell y cols., 2000a; Harms y cols., 2001; Grasland y cols., 2005).

Por otro lado, PRRSv también produce lesiones a nivel del tejido linfoide. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con PCV2, el hallazgo más frecuentemente obsevado es el desarrollo de hiperplasia reactiva linfoide, con hiperplasiaa del centro germinativo, y en ocasiones la presencia de necrosis y espacios quísticos con policariocitos (Collins y cols., 1992; Rossow y cols., 1994b; Cooper y cols., 1995; Halbur y cols., 1995a; Halbur y cols., 1995c; Rossow y cols., 1995). También se ha descrito el desarrollo de nefritis intersticiales y en algunos casos de hepatitis inespecíficas (Pol y cols., 1991; Rossow y cols., 1995; Rossow y cols., 1996a).

En el presente trabajo se realizó un estudio histopatológico de órganos hemolinfoides, así como de riñón e hígado, con el objetivo de identificar lesiones que pudieran estar asociadas a estos patógenos involucrados en el desarrollo del PRDC.

En **órganos linfoides**, concretamente, bazo y linfonodo traqueobronquial, se observó ***depleción linfoide en un 60% y 10%*** de los animales evaluados, respectivamente. Si bien, esta lesión está ampliamente descrita en infecciones por PCV2, en estos animales no se observaron los hallazgos histopatológicos descritos anteriormente (Segalés, 2012). Numerosos trabajos coinciden en que los linfonodos inguinales superficiales e ilíacos son los más frecuentemente afectados siendo las muestras de elección para la detección de lesiones asociadas a PCV2 (Calsamiglia y cols., 2002; Kim y cols., 2003a; Chae, 2004; Quesada-Canales, 2015). Otro hallazgo observado fue la presencia de hiperplasia linfoide reactiva, que aunque ha sido descrita en casos de infección por PRRSv, no es una lesión exclusiva de este agente patógeno.

En algunos casos también se observó ***tonsilitis y linfadenitis supurativas*** con presencia de infiltrado inflamatorio polimorfonuclear. Éstas últimas podrían deberse al drenaje de zonas próximas con infección y más concretamente al drenaje de procesos neumónicos, asociadas a infecciones bacterianas. En la infección por PCV2, es frecuente observar infiltrado inflamatorio eosinofílico en distintos órganos, y entre ellos en linfonodos y tonsila; sin embargo, suelen estar asociados a otras lesiones (Clark, 1997; Segalés y cols., 2002; Segalés, 2012).

Mediante IHQ se detectó ***Ags de PCV2 en un 7%*** de los linfonodos traqueobronquiales estudiados, observándose en un 20% de los lechones. La inmunorreacción se observó mayoritariamente en el citoplasma, y en menor medida, en el núcleo de células de la línea monocito/macrofágica, coincidiendo con las descripciones de varios autores (Choi y cols., 2000b; Sato y cols., 2000; Chianini y cols., 2003; Kim y Chae, 2004a). En estudios de infección natural y experimental se describe la detección de PCV2 con más frecuencia en el tejido linfoide que en el resto de órganos (Rosell y cols., 1999; Segalés y Domingo, 2002; Kim y Chae, 2004; Hansen y cols., 2010b). Si bien el linfonodo inguinal superficial es la muestra más representativas para la detección de PCV2, otros autores también proponen el análisis histopatológico e IHQ del linfonodo traqueobronquial en el diagnóstico de las PCVD (Ha y cols., 2008; Calsamiglia y cols., 2002; Kim y Chae, 2003; Chae, 2004; Sarli y cols., 2009; Lin y cols., 2011). Hansen y cols., (2010b), realizaron un estudio en cerdos híbridos sacrificados en matadero, con clínica asociada a PCV2 y sanos, y describiendo inmunorreacción intracitoplasmática frente a PCV2 en linfonodo traqueobronquial, en un 8% de los animales enfermos y en un 3% de los sanos, con muy baja o nula inmunorreacción en otros órganos.

En animales salvajes de vida libre, también se ha utilizado la IHQ para la detección antigénica de PCV2 en linfonodos y tonsila (Petrini y cols., 2009; Reiner y cols., 2010; Morandi y cols., 2012), donde en algún caso únicamente fue posible su detección en el linfonodo traqueobronquial (Petrini y cols., 2009). Reiner y cols., (2010), detectaron moderada a severa inmunorreación frente a PCV2 en bazo, linfonodos

(traqueobronquial y mesentéricos), tonsila y pulmón en un 0,3% de jabalíes y en un 7% de los cerdos domésticos. Morandi y cols., (2012), observaron inmunorreacción frente a PCV2 en estos tejidos, en un 7,43% de los animales, detectándose a nivel del linfonodo traqueobronquial en un 4%, concomitantemente con lesiones de neumonía intersticial y/o bronconeumonía en pulmones en donde no se identificó PCV2.

En España, se empleó la ISH para la detección de este agente en linfonodos, bazo y otros órganos (pulmón, hígado y riñón) de jabalíes (Vicente y cols., 2004), describiéndose también, una leve expresión de ácido nucleico en células de la línea monocito/macrofágica en un bajo porcentaje de linfonodos (4%), sin observar inmunomarcaje en el resto de órganos analizados.

De acuerdo con los criterios propuestos por otros autores, se descarta el existencia de enfermedad asociada a PCV2 ya que, la explotación de procedencia de estos animales no presentaba antecedentes de sintomatología clínica atribuible a PCV2, no se detectaron otras lesiones histopatológicas características y la inmunorreacción detectada fue leve (Sorden y cols., 2000; Sarli y cols., 2009).

En **riñón**, se observaron ***lesiones macroscópicas y microscópicas de nefritis intersticial*** en un ***23% y 70%*** de los casos, respectivamente, las cuales se caracterizaron por la presencia de infiltrado inflamatorio mononuclear a nivel intersticial en corteza, médula y/o pelvis renal, con organización del infiltrado formando folículos linfoides en algunos casos, o fibrosis. Lesiones similares han sido descritas por otros autores en cerdos sacrificados en matadero observando también la presencia de lesiones microscópicas en riñones aparentemente normales (Drolet y cols., 2002; Martínez y cols., 2006).

Durante muchos años, estas lesiones observadas en cerdos sacrificados en matadero, estuvieron asociadas a *Leptospira interrogans* (Baker y cols., 1989). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que no existe asociación entre este agente etiológico y las nefritis intersticiales observadas (Drolet y cols., 2002; Boqvist y cols., 2003), proponiéndose otros patógenos, como PPV, ADV, PRRSv y PCV2, como los causantes de su desarrollo (Nietfeld y Leslie-Steen, 1993; Drolet y Dee, 1999; Drolet y cols., 2002).

Mediante IHQ, sólo fue posible la detección de ***Ags de PCV2 en riñón en un 7%*** de los casos, pese al elevado porcentaje de animales que presentaban nefritis intersticial microscópicamante. Hansen y cols., (2010c) también han descrito una baja inmunorreacción frente a PCV2 en riñón de animales sanos y enfermos, sacrificados en matadero (Hansen y cols., 2010b). Martínez y cols., en 2006, no encontraron asociación específica entre estos agentes (PCV2 y PRRSv) y las lesiones renales observadas en cerdos sacrificados en matadero. Estos hallazgos sugieren que las nefritis intersticiales observadas pueden deberse a infecciones crónicas por estos patógenos o estar producidas por otros agentes no incluidos en su estudio.

En **hígado** las principales lesiones observadas, estuvieron relacionadas principalmente con parasitosis. Macroscópicamente, se observaron lesiones multifocales, mal delimitada, planas, irregulares, blanquecinas, identificadas como ***hepatitis fibrosa parasitaria*** o hígado con "manchas de leche" en el ***23%*** de los animales, lesiones descritas en parasitosis por *Ascaris suum*, debidas a las migraciones larvarias (Copeman y Gaafar, 1972). En países con alta producción porcina se ha descrito ascaridiasis entre un 12-76% de los animales inspeccionados (Haugegaard, 2010; Lai y cols., 2011). Dependiendo de las prácticas de manejo y de los tratamientos con antihelmínticos, se describen valores entre el 0% y el 100% (Vercruysse y cols., 1997). Algunos autores han descrito un descenso significativo

de ésta, gracias a un exhaustivo programa sanitario (39,5% al 7%) (Ondrejková y cols., 2012). La prevalencia de estas lesiones es mayor en animales criados al aire libre y de ganadería ecológica que en cerdos criados en intensivo (Jolie y cols., 1998; Borgsteede y Jongbloed, 2001). En España se ha descrito prevalencia de ascaridiasis del 29% en cerdo ibérico, en Extremadura, (García, 1999), coincidiendo con lo observado en el presente estudio.

Microscópicamente, estas lesiones se correspondieron con ***hepatitis eosinofílica o fibrosa (33-43%)***, coincidiendo con las lesiones descritas en la ascaridiasis debidas al daño mecánico que ejercen las larvas L3 en su migración por el parénquima hepático, produciéndose posteriormente una reacción de hipersensibilidad con infiltrado de eosinófilos, localizado a nivel de septos interlobulillares, espacios porta y/o sinusoides hepáticos, y en los casos más crónicos con proliferación de tejido conectivo (Copeman y Gaafar, 1972; Nakagawa y cols., 1983; Pérez y cols., 2001). En un 23% de las muestras se observó, infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario organizado formando folículos linfoides (patrón folicular) rodeado por infiltrado eosinofílico y tejido conectivo, coincidiendo con otros autores, y que se describen también asociadas a *Ascaris suum* (Pérez y cols., 2001).

En el CNC, no se observó la presencia de lesiones a nivel pulmonar compatibles con la migración de *Ascaris suum* (en su estadio L3). Sin embargo, se sabe que este parásito contribuye al desarrollo de enfermedades respiratorias en el porcino. Éstos pueden ejercer su acción patógena como parásito primario; causando daño mecánico en el tejido y permitiendo la colonización por patógenos respiratorios, o interfiriendo en la vacunación frente a otros agentes etiológicos (White, 2011). Algunos autores describen una asociación significativa entre la detección de *Ascaris suum* y patógenos pulmonares como Mh, PRRSv y PCV2, con una elevada presencia de lesiones a nivel hepático y pulmonar en animales sacrificados en matadero (Vlaminck y cols., 2015).

Finalmente, otra lesión observada fue la presencia de infiltrado inflamatorio linfocítico, descrito en algunos trabajos asociados a infección por PRRSv o PCV2 (Pol y cols., 1991; Rosell y cols., 1999; Rosell y cols., 2000a). Sin embargo, éstas fueron de leve a moderada, y en ningún caso fue posible detectar Ags viral mediante IHQ.

De los resultados obtenidos, durante la inspección en matadero y el estudio histopatológico e IHQ, realizado en ejemplares de CNC sanos, se evidencia que están predispuestos a padecer PRDC. Por un lado, fue posible observar lesiones de neumonía broncointersticial compatibles con infección por Mh, así como lesiones de neumonía intersticial, que podrían atribuirse a infecciones víricas, como PRRSv o PCV2. En el estudio IHQ a nivel pulmonar, se detectó Mh, tanto en pulmones sanos como asociadas a lesiones de neumonía broncointersticial, aunque no fue posible detectar PRRSv ni PCV2 asociado a las lesiones de neumonía intersticial. Sin embargo, en algunos de estos animales se detectó Ags de PCV2 en otros órganos, con intensidad leve, quedando demostrada la susceptibilidad de esta raza para ser infectada por estos agentes etiológicos.

5.4 ESTUDIO DE CAUSAS DE MUERTES EN EL CNC CON PROCESOS RESPIRATORIOS ASOCIADOS

El examen clínico es de gran valor para el diagnóstico de enfermedades sistémicas y/o respiratorias; si bien, en aquellos casos en donde la clínica está ausente o enmascarada, la realización de una necropsia consistente, exhaustiva, lógica y sistemática adquiere gran valor para obtener un diagnóstico definitivo (Van Alstine, 2012).

El examen post-mortem nos permite dar un diagnóstico morfológico macroscópico y obtener muestras para realizar un estudio histopatológico completo y desarrollar técnicas de diagnóstico que permitan identificar al agente involucrado en el proceso patológico (Torrison, 2012). En algunas ocasiones, es posible dar un diagnóstico definitivo con la toma de muestras de órganos concretos, como por ejemplo, cuando el agente etiológico tiene tropismo únicamente por los pulmones. Sin embargo, para aquellos que producen lesiones multisistémicas, incluyendo al sistema respiratorio, y las lesiones macroscópicas a nivel pulmonar son mínimas, el diagnóstico definitivo va estar condicionado al estudio de otros tejidos.

Para un correcto estudio de los procesos respiratorios, algunos autores recomiendan que, durante la realización de la necropsia se tomen muestras no sólo de pulmón sino también de otros tejidos (Gramer y cols., 2005). Por último, en ocasiones, la realización de la técnica de necropsia de forma completa y sistemática puede estar condicionada por el lugar en donde se realiza la necropsia, así como por la especie en cuestión (Torrison, 2012).

En los otros estudios del presente trabajo, los ejemplares de CNC analizados eran animales sanos, que no presentaron clínica asociada a procesos respiratorios. Sin embargo, fue posible demostrar que habían tenido contacto con agentes patógenos involucrados en el desarrollo del PRDC, al presentar inmunidad frente a ellos, y/o Ags en los tejidos, evidenciando la existencia de infección subclínica.

Durante el periodo comprendido entre el año 2007-2012, se realizó un total de 25 necropsias en CNC en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria. Estas se realizaron siguiendo el protocolo propuesto por King y colaboradores (1989).

En el ***54%*** de los animales, se observaron ***lesiones macroscópicas a nivel pulmonar, asociadas a procesos inflamatorios***. Algunos autores sugieren que más del 70% de los cerdos que mueren al final de la fase de cebo tiene lesiones macroscópicas compatibles con PRDC (Lowe y cols., 2004). Los principales patrones morfológicos macroscópicos observados en estos animales fueron ***bronconeumonía supurativa (43%)***, caracterizadas microscópicamente, por infiltrado inflamatorio polimorfonuclear en vías aéreas y alveolos (bronconeumonía purulenta), observándose en casos más crónicos neumonía broncointersticial, compatibles a infección por Mh (Lium y Falk, 1991; Strasser y cols., 1992, Dungworth, 1993; Sorensen y cols., 1997; Ross, 1999). También se describió la presencia de ***bronconeumonía fibrinonecrótica (7%)***, focal en lóbulo caudal, mal delimitada, de color rojo intenso, con región central rojo oscura y bordes blanquecinos, acompañada de pleuritis fibrosa, correspondiéndose microscópicamente con bronconeumonía fibrinopurulenta compatibles a infección por App (Nicolet, 1992; Marsteller y cols., 1999; Gottschalk y Taylor, 2006).

Sin embargo, estas lesiones pulmonares no son atribuibles sólo a infección por los agentes etiológicos mencionados, y no se deben emplear como único criterio para establecer un diagnóstico definitivo. Otros patógenos bacterianos también pueden producir patrones de bronconeumonía similares a los descritos en estos animales, como *P. multocida, B. bronchiseptica*, *H. parasuis*, *A. pyogenes*, *S. choleraesuis,* entre otros (Pijoan, 1999; Schwartz, 1997; Griffith y cols., 2006; Aragón y

cols., 2012; Brockmeier y cols., 2012). Por otro lado, patógenos víricos como SIv, puede producir neumonía broncointersticial similar a la descrita para Mh (Thacker y cols., 2001).

En un ***21%*** de los animales se observó macroscópicamente, ***neumonía intersticial*** caracterizada por consolidación difusa del parénquima pulmonar o multifocal con demarcación lobulillar, de superficie brillante, pálida, consistencia elástica, con ausencia de colapso pulmonar e impresiones costales, confirmándose la presencia de neumonía intersticial, a nivel microscópico, asociadas con infecciones víricas, causadas por PRRSv y PCV2, entre otros (Dea y cols., 1992; Stephenson y cols., 1993; Done y Paton, 1995; Rossow y cols., 1995; Lager y Halbur 1996; Clark, 1997; Segalés y cols., 1997; Rossow, 1998; Ellis y cols., 1999b). También se identificaron procesos crónicos, conjuntamente con bronquitis, caracterizadas por la presencia de infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario en pared bronquial, con necrosis y pérdida de epitelio respiratorio, así como severo exudado inflamatorio en vías aéreas. Lesiones similares han sido asociadas a infección por PCV2 (Clark, 1997; Gillespie y cols., 2009; Segalés, 2012).

En varios casos se observaron lesiones de ***bronconeumonía supurativa conjuntamente con neumonía intersticial y ocasionalmente con bronconeumonía fibrinonecrótica.*** Estos hallazgos coinciden con numerosos autores en la descripción de las lesiones observadas en los casos de PRDC (Dee y cols., 1996; Halbur, 1998; Harms y cols., 2002; Thacker, 2002; Bochev, 2007). De manera que, a partir del diagnóstico morfológico macroscópico y microscópico realizado, podríamos sugerir, que parte de la mortalidad observada en los ejemplares de CNC fue debida a PRDC; no obstante su confirmación requiere de la realización de técnicas de diagnóstico complementarias.

Del total de ejemplares de CNC diagnosticados con procesos respiratorios, se llevó a cabo técnicas inmunohistoquímicas para la ***detección de Ags*** de Mh, PRRSv y PCV2; detectándose estos agentes patógenos ***en un 43% de los casos***. Así, se observó inmunorreacción frente a ***Ags de PCV2 en un 14%*** de los animales presentó, ***frente a PRRSv en otro 14%*** y el ***7% restante frente a Mh***.

5.4.1 CASOS DE ENFERMEDAD ASOCIADA A PCV2.

- ✓ ***Síndrome multisistémico de adelgazamiento post-destete***

La primera descripción de PMWS se realizó en 1991 (Clark, 1996a; Harding, 1996) aunque las lesiones histopatológicas características de este síndrome junto con la presencia de antígeno de PCV2 han sido identificadas retrospectivamente desde 1985 (Jacobsen et al., 2009). Desde entonces ha sido diagnosticado en los 5 continentes (Grau-Roma et al., 2011), considerándose ubicuo en la población porcina. En España fue descrito por primera vez en 1997 (Segalés y cols., 1997), y en las Islas Canarias en el cerdo híbrido en el 2000 (Andrada y cols., 2000). Este síndrome se incluye dentro del grupo de enfermedades sistémicas asociadas a PCV2 y afecta a animales de 2 a 4 meses de edad (Harding y cols., 1998; Segalés y Domingo, 2002; Harding, 2004; Opriessnig y cols., 2007; Carman y cols., 2008; Grau-Roma y cols., 2011; Segalés, 2012).

Clínicamente se caracteriza por adelgazamiento o pérdida de peso, palidez de la piel, pelo hirsuto, distrés respiratorio, diarrea y, en ocasiones, ictericia (Harding y Clark, 1997; Rosell et al, 1999; Krakowka y cols., 2000), correspondiéndose con la sintomatología observada en dos de los animales incluidos en el presente estudio (N4 y N16).

Las lesiones macroscópicas a nivel pulmonar descritas en el PMWS, se corresponden con neumonía intersticial (Segalés, 2012). En el CNC, además de presentarse ***neumonía intersticial*** severa difusa, también se observó lesiones asociadas de ***bronconeumonía supurativa*** moderada, lo que sugiere la participación de agentes bacterianos asociados en el desarrollo del cuadro lesional, en combinación con las lesiones de origen viral (Dee y cols., 1996; Halbur, 1998; Harms y cols., 2002; Thacker, 2002; Segalés y cols., 2005a; Bochev, 2007).

En jabalíes también se han referenciado casos de PMWS, en Norteamérica y Europa (Ellis y cols., 2003; Schulze y cols., 2004; Sofia y cols., 2008), habiéndose observado también en España (Vicente y cols., 2004) en animales de 6-10 meses de edad con neumonía intersticial. Esto difiere de los casos diagnosticados en el CNC con 1,5 meses, en donde además se observaron otros patrones morfológicos, como bronconeumonía supurativa (Ellis y cols., 2003; Sofia y cols., 2008). Los hallazgos más frecuentemente observados en los cerdos híbridos son la presentación de una linfadenomegalia generalizada, principalmente en inguinales superficiales, mediastínicos y mesentéricos, presencia de nefritis intersticial, así como hepatomegalia, úlceras gástricas a nivel de la *pars oesophagea*, atrofia serosa de la grasa y serositis (Clark, 1997; Rosell y cols., 1999; Segalés y cols., 2004; Opriessnig y cols., 2007; Segalés, 2012; Opriessnig y Langohr, 2013).

En los casos de PMWS presentados en el CNC, también se observó ***linfadenomegalia generalizada de moderada a severa***, así como ***nefritis intersticial*** coincidiendo con lo descrito en el cerdo híbrido. En el jabalí también se referencia la linfadenomegalia generalizada (Ellis y cols., 2003; Schulze y cols., 2004; Sofia y cols., 2008), ocasionalmente lesiones en bazo e hígado (Sofia y cols., 2008), o enterocolitis y úlceras en la región fúndica de la mucosa gástrica (Ellis y cols., 2003). En ninguno de estos trabajos se describe la presencia de lesiones macroscópicas a nivel renal, a diferencia de lo observado en el CNC.

Aunque con menor frecuencia, en híbridos, PCV2 también ha sido asociado a sintomatología nerviosa que incluye apatía, ataxia, pedaleo, opistótonos, nistagmo y convulsiones (Corrêa y cols., 2007; Seeliger y cols., 2007). Macroscópicamente, las lesiones referenciadas, se centran principalmente a nivel de cerebelo con ***petequias en leptomeninges*** y edema, así como hiperemia y ***hemorragias*** en el parénquima, predominantemente ***en la materia gris y blanca del cerebelo*** (Bukovsky y cols., 2007; Corrêa y cols., 2007; Seeliger y cols., 2007). En uno de los casos de CNC se describió sintomatología nerviosa, observándose en ambos casos, un cuadro lesional en el SNC similar al descrito en cerdos híbridos.

Otros hallazgos macroscópicos encontrados en estos ejemplares de CNC, fueron: la presencia de ***ascitis, peritonitis fibrinosa, hidropericardio y pleuritis fibrinosa*** moderada en ambos casos. En el hígado también se observó ***hepatitis fibrosas*** parasitarias asociadas a *Ascaris suum* (Copeman y Gaafar, 1972). En animales con PCVD, se ha descrito un aumento de la susceptibilidad a padecer una amplia variedad de infecciones de origen parasitario (*Ascaris suum, Cryptosporidium parvum, Toxoplasma gondii, Balantidium, Metastrongylus elongatus)*, debido a un estado de inmunosupresión (Núñez y cols., 2003; Yazar y cols., 2004; Kleins y cols., 2010; White, 2011; Marruchella y cols., 2012; Vlaminck y cols., 2015).

Microscópicamente, las lesiones observadas en ambos casos en pulmón, se correspondieron principalmente con ***neumonía intersticial*** severa ***y neumonía broncointersticial*** de leve a moderada. Estas lesiones han sido descritas previamente en casos de PMWS en híbridos donde se incluyen neumonía intersticial o broncointersticial, fibrosis peribronquiolar, bronquiolitis obliterante,

bronconeumonia fibrinopurulenta o catarral-purulenta, entre otros (Magar y cols., 2000a; Bolin y cols., 2001; Segalés y Domingo, 2002; Segalés y cols., 2005a; Szeredi y Szentirmai, 2008; Cheng y cols., 2011). Estos patrones morfológicos combinados también han sido descritos, a nivel pulmonar en jabalíes (Ellis y cols., 2003).

Además, se observó ***vasculitis*** en septos interlobulillares, ***con trombosis asociada***, lesión que también se ha descrito en otras presentaciones de enfermedad pulmonar asociada a PCV2 (PNP) o en el PDNS (Segalés, 2012). Algunos autores describen estos procesos vasculares asociados a infección por PCV2, en animales infectados y en muy bajo porcentaje en animales no infectados, detectando Ags virales, aunque no siempre asociados a los procesos vasculares (Szeredi y cols., 2012). Si bien, existen otros agentes etiológicos (PRRSv, SIv, PRCv, *P. multocida, Actinobacillus* spp*., Salmonella* spp. o *Streptococcus* spp.) los cuales también se han identificado asociados a este tipo de lesiones, solos o en coinfección con PCV2 (Segalés y cols., 2004; Szeredi y cols., 2012; Opriessnig y Langohr, 2013).

Las lesiones microscópicas más importantes presentes en el CNC, se observaron a nivel del ***tejido linfoide***, con ***severa depleción linfoide e histiocitosis*** en bazo, linfonodos y tonsila, así como la presencia de ***sincitios y cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en macrófagos***, lesiones similares a las descritas en cerdos híbridos y jabalíes con PMWS (Clark, 1997; Rosell y cols., 1999; Allan y Ellis, 2000; Allan y cols., 2000; Sorden, 2000; Ellis y cols., 2003; Vicente y cols., 2004; Sofía y cols., 2008). Además, en el CNC, también se identificaron estas lesiones en placas de Peyer, coincidiendo con lo descrito en híbridos (Allan y Ellis, 2000; Kim y cols., 2004a; Zlotowski y cols., 2008).

La principal lesión histológica observada en riñón fue ***nefritis intersticial linfoplasmocitaria***, coincidiendo con descripciones realizadas en infecciones por PCV2 en híbridos donde también se ha observado la presencia de sincitios (Rosell y cols., 1999; Segalés y Domingo, 2002; Sarli y cols., 2008). Si bien, estos últimos no han sido observados en las muestras analizadas de CNC ni en los casos de PMWS descritos en jabalíes (Sofia y cols., 2008).

A nivel del SNC las lesiones microscópicas observadas se correspondieron con hemorragia, procesos de vasculitis e infiltrado inflamatorio linfohisticítico a nivel del encéfalo y meninges, correspondiéndose con ***meningoencefalitis no supurativa y vasculitis***. Estas lesiones han sido descritas en infecciones por PCV2 (Allan y cols., 1999; Rosell y cols., 1999; Kennedy y cols., 2000; Fenaux y cols., 2002; Corrêa y cols., 2007; Seeliger y cols., 2007), si bien también se han referenciado en infecciones por PRRSv (Halbur y cols., 1995; Rossow y cols., 1999).

En hígado, observamos ***hepatitis linfohistiocítica*** periportal, coincidiendo con las lesiones clasificadas como grado I, en infecciones por PCV2 y que se caracterizan por un leve infiltrado linfohistiocítico multifocal en torno a los espacios porta (Rosell y cols., 2000a). Otras lesiones descritas en híbridos se corresponden con una marcada pérdida de hepatocitos, aumento de la cantidad de tejido fibroso, infiltrado inflamatorio difuso y presencia de sincitios (Rosell y cols., 1999; Krakowka y cols., 2000; Rosell y cols., 2000a).

Conjuntamente, se observó ***miocarditis no supurativa***, lesión previamente descrita en infecciones por PCV2, observadas principalmente en fetos (Ellis y cols., 1999b; West y cols., 1999; O´Connor y cols., 2001; Sánchez y cols., 2001a; Mikami y cols., 2005; Brunborg y cols., 2007; Pescador y cols., 2007; Madson y cols., 2009; Opriessnig y Langohr, 2013).

Los animales en los cuales se ha descrito lesiones asociadas a PCV2, en este estudio, tenían 1,5-2 meses, si bien, otros autores han descrito procesos de miocarditis no supurativa también en lechones de 1-1,5 meses en infección natural por PCV2 (Opriessnig y cols., 2006a). Otros agentes virales como PRRSv o PPv también pueden causar miocarditis no supurativa (Halbur y cols., 1995; Bolt y cols., 1997; Rossow, 1998; Harms y cols., 2001).

Para establecer un diagnóstico definitivo de PMWS, la detección de PCV2 puede llevarse a cabo mediante IHQ, considerada, junto con la ISH, como "gold standard" en el diagnóstico de PCVD (Sorden, 2000; Segalés y cols., 2003; Kim y Chae, 2004; Ghebremariam y Gruys, 2005), utilizando sueros policlonales o Acs monoclonales para la detección de Ags de PCV2, existiendo una alta correlación entre la severidad de la lesiones microscópicas y la cantidad de Ags detectados (Rosell y cols., 1999; Calsamiglia y cols., 2002; Chianini y cols., 2003; Opriessnig y cols., 2004; Krakowka y cols., 2005).

Mediante IHQ, fue posible detectar ***Ags de PCV2*** en varios órganos. En ***pulmón*** se observó inmunorreacción en ***macrófagos alveolares y células histiocíticas*** presentes en las paredes alveolares; en ***macrófagos activados y sincitios***, en epitelio respiratorio y a nivel del BALT. En ***tejido linfoide*** se detectó una intensa inmunorreacción granular frente a Ags de PCV2, en el citoplasma y/o núcleo de las ***células histiocíticas y dendríticas***, en ***células de naturaleza linfoide y sincitios***, observándose en ocasiones, inmunomarcaje también en ***cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos***. Asimismo, también fue posible detectar PCV2 en ***intestino***, en el infiltrado inflamatorio presente en la lámina propia y en ***riñón***, en citoplasma de macrófagos y células de la línea linfocítica presentes en el infiltrado inflamatorio, en células epiteliales de los túbulos renales y en células endoteliales. Estas localizaciones coinciden con las descritas en casos de infecciones naturales por PCV2 y en trabajos de inoculación experimental (Ellis y cols., 1998; Allan y cols., 1999a; Ellis y cols., 1999b; McNeilly y cols., 1999; Rosell y cols., 1999; Choi y cols., 2000; Kennedy y cols., 2000; Magar y cols., 2000a; Sato y cols., 2000; Harms y cols., 2001; Fenaux y cols., 2002; Saoulidis y cols., 2002; Chianini y cols., 2003; Kim y Chae, 2004; Haruna y cols., 2006; Harding y cols., 2008; Hansen y cols., 2010b; Szeredi y cols., 2012). A nivel hepático, no fue posible detectar Ags de PCV2. Esto podría deberse, por un lado, a que no es un órgano que frecuentemente encuentra comprometido en los cuadros de PMWS y por otro a variaciones debidas al estadio de la enfermedad o la cepa de PCV2 involucrada (Sato y cols., 2000).

Finalmente, en el ***SNC*** también se observó inmurreacción frente a PCV2 en vasos sanguíneos, en las células inflamatorias presentes en la pared y en células endoteliales, en los procesos de vasculitis observados en cerebro y en células endoteliales de vasos sanguíneos con procesos de hemorragia asociados, presentes en cerebelo, coincidiendo con las escasas descripciones referenciadas en la bibliografía de casos naturales de PCV2 (Corrêa y cols., 2007; Seeliger y cols., 2007).

Los ***criterios de diagnóstico de PMWS*** están muy bien definidos y se considera que un cerdo o grupo de cerdos presentan PMWS si se describe (1) sintomatología clínica que incluya retraso del crecimiento y adelgazamiento, frecuentemente con disnea y aumento del tamaño de los linfonodos inguinales, y ocasionalmente ictericia; (2) lesiones microscópicas características en los tejidos linfoides (depleción linfoide junto con histiocitosis y presencia de cuerpos de inclusión) y/o inflamación linfohistiocítica con presencia de células gigantes multinucleadas en otros órganos (pulmón, hígado, riñón, intestino, páncreas, etc.) y (3) detección de PCV2, de moderada a severa, en las lesiones microscópicas observada en los tejidos linfoides y en otros tejidos de los animales afectados (Sorden, 2000; Segalés, 2002). De acuerdo con estos criterios, se confirma que dos de los ejemplares de CNC incluidos en el presente estudio desarrollaron PMWS, siendo la primera vez que se describe en esta raza.

- ✓ ***Síndrome de Dermatitis y Nefropatía porcina***

Un ejemplar de CNC de 7 meses de edad (N5), incluido en este estudio, presentó lesiones macroscópicas en **piel**, caracterizadas por la presencia de ***máculas y pápulas*** de morfología irregular y color rojo a violáceo en extremidades posteriores, abdomen y tórax. Estas lesiones se han referenciado en enfermedades asociadas a PCV2, siendo características en el desarrollo del PDNS (Segalés y cols., 1998; Thibault y cols., 1998; Drolet y cols., 1999). Microscópicamente, estas lesiones se correspondieron con una severa ***dermatitis necrótica*** multifocal, ***asociada a procesos de vasculitis necrotizante*** de los capilares y arteriolas de dermis, además de hemorragias multifocales, coincidiendo con descripciones realizadas en cerdos híbridos (Segalés y cols., 1998; Drolet y cols., 1999).

Conjuntamente con las lesiones anteriormente descritas, se observó infiltrado inflamatorio, material necrótico y detritus celulares en el estrato córneo asociadas a la presencia de estructuras parasitarias de *Sarcoptes scabiei* e infiltrado inflamatorio eosinofílico perivascular en dermis superficial. Estas lesiones se describen asociadas a parasitosis por este agente patógeno (Greve y Davies, 2012).

En **riñón** se observó, macroscópicamente, ***nefritis intersticial***; sin embargo, otras lesiones observadas en el PDNS se caracterizan por un aumento de tamaño de los riñones, consistencia firme, superficie cortical finamente granular y presencia de lesiones puntiformes rojizas y edema en pelvis renal (Helie y cols., 1995; Ramos-Vara et al 1997; Segalés y cols., 1998). Microscópicamente, se observó en el espacio glomerular, la presencia de exudado fibrinoso, sangre e infiltrado linfocítico y células inflamatorias necróticas, correspondiéndose con una ***glomerulitis fibrinonecrotizante***, coincidiendo con las lesiones descrita en cerdos híbridos (Helie y cols., 1995; Segalés y cols., 1998; Thibault y cols., 1998; Drolet y cols., 1999; Rosell y cols., 2000b; Segalés y cols., 2012).

Algunos estudios sugieren que estas lesiones son debidas a una reacción de hipersensibilidad tipo 3 frente a PCV2, caracterizada por el depósito de complejos inmunocomplejos en el espacio glomerular (Wellenberg y cols., 2004). Conjuntamente, se observó ***nefritis intersticial y túbulonefrosis*** con material proteináceo en la luz de los túbulos renales, así como glóbulos hialinos intracitoplasmáticos en epitelio tubular, hallazgos descritos en el PDNS (Ramos-Vara y cols., 1997; Segalés y cols., 1998; Thibault y cols., 1998; Rosell y cols., 2000b; Segalés y cols., 2012).

Si bien, los más afectados fueron piel y riñón, también se encontraron lesiones en otros órganos. Macroscópicamente, se observó ***neumonía intersticial conjuntamente con bronconeumonía supurativa***, así como ***linfadenomegalia*** moderada a severa generalizada y ***úlceras gástricas*** en región glandular. Éstas últimas frecuentemente se presentan en cerdos afectados de PCV2, pero sobre todo a nivel de *pars oesophagea* y en casos de PMWS (Segalés y Domingo, 2002). Estas lesiones se correspondieron, microscópicamente, con ***depleción linfoide, histiocitosis y sincitios en tejido linfoide*** (bazo, linfonodos y placas de Peyer), ***neumonía intersticial, enteritis y hepatitis linfohistiocítica***, donde además fue posible observar ***sincitios a nivel periportal***, así como ***miocarditis y meningitis no supurativa***. Estas observaciones concuerdan, con numerosos trabajos de infección por PCV2 (Ramos-Vara y cols., 1997; Segalés y cols., 1998; Thibault y cols., 1998; Ellis y cols., 1999b; Rosell y cols., 1999; West y cols., 1999; Krakowka y cols., 2000; Rosell y cols., 2000 a y b; O´Connor y cols., 2001; Mikami y cols., 2005; Opriessnig y cols., 2006a; Brunborg y cols., 2007; Segalés y cols., 2012).

Aunque otros agentes patógenos víricos, incluidos PRRSv (Segalés y cols., 1998; Thibault y cols., 1998) o bacterianos, como *P. multocida* (Thomson y cols., 2001; Lainson y cols., 2002) han sido descritos como posibles agentes etiológicos del PDNS, muchos autores defienden la hipótesis de que se trata de una enfermedad o síndrome asociado a PCV2. En el año 2000, Rosell y cols., fueron los primeros en

considerar que PCV2 podía estar involucrado en la patogenia del PDNS. Si bien no se observó ADN de PCV2 mediante ISH asociado a las lesiones, éste fue detectado en al menos uno de los tejidos de todos los cerdos analizados que presentaban PDNS. En este animal ***no*** fue posible detectar ***Ags de PCV2 mediante IHQ***.

Actualmente, se desconocen los mecanismos etiopatogénicos de este síndrome, y/o su base inmunopatológica. Algunos autores describen una presencia excesiva de niveles de Acs frente a PCV2 en casos de PDNS, y si bien no ha sido detectado mediante IHQ, sí se identificó ADN de PCV2, mediante PCR, en ausencia de ácido nucleico de otros virus (PPv y PRRSv) en muchos de los casos de PDNS (Wellenberg y cols., 2004). Krakowka y cols., (2008) intentaron reproducir experimentalmente la enfermedad y, aunque fue posible observar el cuadro lesional a nivel macroscópico y microscópico, no consiguieron identificar a PCV2. Según estos autores, el PDNS sería la manifestación de una coagulación intravascular diseminada (CID), y agentes etiológicos con tropismo por la piel y toxinas serían capaz de activar la cascada de la coagulación y desencadenar un PDNS.

Los criterios propuestos para el diagnóstico de PDNS como enfermedad asociada a PCV2, están relacionados con: (1) la presencia de lesiones necrotizantes y hemorrágicas en piel y/o riñones pálidos y aumentados de tamaño, con petequias corticales generalizadas, así como (2) la detección de vasculitis necrotizante sistémica y glomerulonefritis fibrinosa y necrotizante (Smith y cols., 1993; Helie y cols., 1995). No siendo necesario, desde el punto de vista diagnóstico, la detección de PCV2 (Segalés y cols., 2005a). En el presente caso, se observaron lesiones macroscópicas y microscópicas consistentes, que coinciden con las descripciones realizadas por numerosos autores. No se ha encontrado en la bibliografía referencias sobre este síndrome en animales salvajes de vida libre, siendo esta, no solo la primera descripción del PDNS en el CNC, sino también en una raza porcina distinta a la híbrida.

5.4.2 CASOS CON SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO

Dos animales 2,5-3,5 meses de edad (N22 y N23), presentaron sintomatología nerviosa, pedaleo, rigidez en cuello y edema en párpados, muriendo a los 2-3 días. Estos signos clínicos pueden estar asociados entre otros, con infección post-destete por PRRSv, que incluyen fiebre, hiperemia cutánea, pelo hirsuto, anorexia, disnea en ausencia de tos, edema periocular, secreción nasolagrimal, linfoadenopatía, disminución de la tasa de crecimiento, y aumento de la tasa de mortalidad (Loula, 1991; Terpstra y cols., 1991; Busse y cols., 1992; Rossow y cols., 1994b; Dee y cols., 1997; Zimmermann y cols., 2006; Fan y cols., 2013). Otros autores también han observado sintomatología nerviosa, con letargia, convulsiones y pedaleo (Keffaber, 1989; Loula, 1991; Rossow y cols., 1999) que coinciden con la clínica presentada en animales objeto de estudio; si bien estas descripciones se han realizado en lechones neonatos y no en animales destetados, como es el caso de estos lechones de CNC.

En lechones, la infección con el virus PRRS no produce lesiones características, como ocurre en las infecciones por PCV2, si bien la neumonía intersticial es un hallazgo frecuente en la presentación de enfermedad respiratoria, que con frecuencia en infecciones naturales se pueden encontrar complicadas secundariamente por otros agentes bacterianos y/víricos (Collins y cols., 1992; Done y cols., 1992; Hopper y cols., 1992; Halbur y cols., 1993b; Done y Paton, 1995; Halbur y cols., 1995b; Zimmerman y cols., 2006; Kim y cols., 2011). Además, es frecuente observar los linfonodos afectados, presentando linfadenomegalia (Ohlinger y cols., 1991; Rossow y cols., 1994b; Done y Paton, 1995; Halbur y cols., 1995a; Halbur y cols., 1995b; Rossow y cols., 1995; Zimmerman y cols., 2006; Kim y cols., 2011).

Estas lesiones coinciden con los hallazgos macroscópicos observados, donde además de una ***linfadenomegalia generalizada***, fue posible observar ***neumonía intersticial*** y un patrón morfológico más característico de ***bronconeumonía supurativa***, así como edema parpebral, entre otros (Collins y cols., 1992; Rossow y cols., 1994b; Rossow y cols., 1995).

Microscópicamente, se observó ***neumonía intersticial***, coincidiendo con la descripción de numerosos trabajos, donde además mencionan la ***hiperplasia del BALT***, observada también en estos casos (Collins y cols., 1992; Done y Paton, 1995; Rossow y cols., 1995; Cheon y Chae, 1999; Zimmerman y cols., 2006; Kim y cols., 2011; Fan y cols., 2013).

En estudios experimentales, se ha descrito la presencia de edema y necrosis de folículos linfoides en linfonodos, en infecciones recientes, observando en estadios más avanzados una hiperplasia del tejido linfoide. Otras lesiones microscópicas descritas han sido, miocarditis linfohistiocítica perivascular o vasculitis, encefalitis no supurativa y nefritis intersticial (Collins y cols., 1992; Dea y cols., 1992; Halbur y cols., 1995c; Rossow y cols., 1994 a y b, 1995; Cooper y cols., 1997; Thanawongnuwech y cols., 1997; Cheon y Chae, 1999; Fan y cols., 2013). Otros autores han observado sólo las lesiones microscópicas descritas en pulmón, linfonodos y miocardio (Kim y cols., 2011). En el presente trabajo, en condiciones naturales, fue posible observar ***hiperplasia linfoide reactiva en linfonodos*** y ***leve nefritis intersticial***. Además, presentaron cuadros de ***enteritis linfoplasmocitaria***, con severa necrosis de vellosidades en uno de ellos. Algunos autores referencian que, en algunas ocasiones, los brotes de PRRS pueden verse complicados, no solo por cuadros neumónicos de origen bacteriano, sino también por procesos septicémicos o entéricos (Yaeger y cols., en 2002).

Mediante IHQ, fue posible detectar ***Ags de PRRSv***, observándose inmunorreacción débil en ***pulmón*** y de forma más intensa en ***linfonodos, bazo y tonsila***, en ambos animales. La replicación del PRRSv se produce principalmente en el pulmón y en los órganos linfoides, persistiendo en éstos últimos durante un largo periodo de tiempo (Rossow y cols., 1996; Wills y cols., 1997a; Horter y cols., 2002). Sin embargo, se ha descrito escasa detección de Ag de PRRSv, mediante IHQ, en pulmones que presentaban neumonía intersticial inducida experimentalmente (Ramírez y cols., 2008). En tonsila se ha descrito la persistencia del PRRSv hasta los 151 dpi (Wills y cols., 2003), jugando este órgano un papel fundamental como barrera primaria en la replicación y diseminación del virus (Albina y cols., 1994; Wills y cols., 1997a; Allende y cols., 2000; Lamontagne y cols., 2001; Horter y cols., 2002).

En el diagnóstico del virus PRRS, la IHQ se considerada que tiene una elevada especificidad (cerca del 100%), oscilando la sensibilidad, entre el 40% y el 95%, en su detección a nivel pulmonar (Halbur y cols., 1996). Factores como la zona pulmonar seleccionada, el número de secciones pulmonares procesadas, la fijación del tejido, así como el tiempo de fijación, pueden afectar considerablemente, la sensibilidad de la IHQ, lo que podría explicar la débil detección el virus a este nivel. (Halbur y cols., 1994; Rossow y cols., 1995; Halbur y cols., 1996; Rossow, 1998; Van Alstine y cols., 2002; Yaeger 2002; Quezada y cols., 2004).

Independientemente de la intensidad de la inmunorreacción, ésta fue observada en ***macrófagos alveolares***, así como en el citoplasma de ***histiocitos y células dendríticas en tejido linfoide*** y en ***macrófagos*** localizados en el infiltrado inflamatorio ***a nivel intestinal***, lo que nos permite confirmar que PRRSv también es capaz de causar infección y enfermedad en la raza del CNC. Esta localización ha sido ampliamente descrita en numerosos trabajos, donde los Ags de PRRSv han sido identificados mediante IHQ en tejidos de cerdos en infecciones naturales como experimentales, observándose principalmente en células de la línea histiocítica (Rossow y cols., 1996a; Larochelle y Magar, 1997; Sur y cols., 1998;

Rossow y cols., 1999; Rovira y cols., 2002; Segalés y cols., 2002; Quezada y cols., 2004; Kim y cols., 2011). A nivel pulmonar, la replicación del virus ocurre fundamentalmente en la población de macrófagos alveolares e intravasculares, de ahí que su detección mediante IHQ en estas células (Wensvoort y cols., 1991; Voicu y cols., 1994; Rossow y cols., 1995 y 1996a, Thanawongnuwech y cols., 2000).

En el estudio serológico del presente trabajo, se observó valores muy bajos de Acs frente a este agente patógeno, presuponiendo, por tanto una presión de infección muy baja, situación similar a la descrita en otras razas porcinas de vida libre. Por otro lado, en el estudio anatomopatológico tampoco se detectó Ags de PRRSv mediante IHQ en los tejidos analizados en matadero. En estos dos animales, sí fue posible observar la presentación clínica y lesional de la enfermedad, así como la detección de Ags virales. Se debe hacer hincapié en los antecedentes epidemiológicos de esta explotación, en donde convivían ejemplares de CNC con cerdos híbridos, en un sistema de producción en intensivo. En estas condiciones, es muy probable que la presión de infección de PRRSv fuera mayor, quedando los animales expuestos a la infección por este patógeno y pudiendo desarrollar la enfermedad.

5.4.3 COINFECCION *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE – SALMONELLA* SP.

Otro lechón de 1,5 meses (N8) presentó sintomatología clínica caracterizada por letargia, deshidratación, hipotermia, caquexia, vómito amarillo, exudado nasal mucopurulento, ictericia, pelo hirsuto y estertores respiratorios.

Este animal presentó, en **pulmón**, lesiones macroscópicas de ***bronconeumonía supurativa*** ampliamente descritas en procesos de infección por Mh (Lium y Falk, 1991; Strasser y cols., 1992; Dungworth, 1993; Sorensen y cols., 1997; Fraile y cols., 2010; Thacker, 2010; Meyns y cols., 2011). Microscópicamente, se observó exudado neutrofílico y linfohistiocítico, edema y fibrina en luz alveolar, *e*xudado inflamatorio y moco en luz de vías aéreas, necrosis en bronquiolos de pequeño calibre y hemorragia multifocal y necrosis en paredes alveolares. Estas lesiones se correspondieron con una ***bronconeumonía fibrinopurulenta*** compatible con agentes patógenos bacterianos como *P. multocida, B. bronchiseptica*, *H. parasuis, Actinobacillus* spp. o *Salmonella* spp., en casos de septicemia (Pijoan, 1999; Griffith y cols., 2006; Gottschalk y Taylor, 2006; Brockmeier y cols., 2012; Aragón y cols., 2012).

Pese a que las lesiones macroscópicas sugerían una infección por Mh, las lesiones microscópicas no se correspondieron con el patrón morfológico de neumonía broncointersticial con hiperplasia del BALT, descrita por numerosos autores, asociada a este patógeno (Dungworth y cols., 1993; Sorensen y cols., 1997). Si bien, en el desarrollo del PRDC estas lesiones pueden verse modificadas por la participación de otros agentes patógenos (Brockmeier y cols., 2002; Bochev, 2007; Hansen y cols., 2010c). Sin embargo, aunque no se observaron estas lesiones microscópicas características, sí fue posible la detección de ***Ags de Mh*** mediante **IHQ** en este animal. La inmunorreacción frente a Mh fue observada en la superficie del epitelio respiratorio en bronquios y bronquiolos como un inmunomarcaje granular de color rojo, coincidiendo con las descripciones realizadas por numerosos autores en razas híbridas, jabalíes y cerdo ibérico (Andrada, 2001; Sarradell y cols., 2003; Opriessnig y cols., 2004; Lorenzo y cols., 2006; Redondo y cols., 2009; Sibila y cols., 2009, 2010; Risco y cols., 2015).

Sin embargo, los hallazgos macroscópicos y microscópicos más relevantes en este animal, se localizaron en el **sistema digestivo**. En serosa de ciego y colon, se observaron lesiones multifocales, blanquecinas, de consistencia firme y en la mucosa, lesiones bien delimitadas, irregulares, con bordes sobreelevados y con exudado blanquecino amarillento adherido en la región central correspondiéndose con ***tiflitis y colitis fibrinonecrótica***. Estas lesiones han sido descritas en casos de salmonelosis, tanto en su presentación entérica, como septicémica, asociadas frecuentemente al aislamiento de *S. enterica* serovar Typhimurium y *S.* Choleraesuis (Pérez y cols., 1999; Oliveira y cols., 2005; Griffith y cols., 2006).

Las lesiones microscópicas inducidas por estas bacterias, y que coinciden con nuestras observaciones, se corresponden con necrosis de enterocitos, en las criptas o superficie de las vellosidades, presentando en la lámina propia y submucosa gran cantidad de infiltrado inflamatorio mixto. Esta necrosis puede extenderse hasta la capa muscular de la mucosa, submucosa, llegando a afectar el tejido linfoide asociado, en algunos casos es posible observar la presencia de trombos con fibrina y leucocitosis en vasos sanguíneos (Pérez y cols., 1999; Griffith y cols., 2006).

Conjuntamente, observamos ***necrosis hepática multifocal***, estasis de la vesícula biliar con edema en la pared, tonsilitis fibrinonecrótica focal bilateral y linfodenomegalia de linfonodos mesentéricos. Microscópicamente, se observaron lesiones multifocales de necrosis hepática, con detritus celulares en la región central, rodeada por un severo infiltrado inflamatorio mixto. También se encontraron pequeños focos de necrosis con infiltrado linfohistiocítico, vasculitis y trombosis (***nódulos paratíficos***). Estas lesiones coinciden con los hallazgos descritos, con mayor frecuencia, en la forma septicémica de la salmonelosis (Griffith y cols., 2006). En jabalíes también se ha referenciado un brote de salmonelosis septicémica, con lesiones similares a las expuestas anteriormente, identificándose *S. choleraesuis* como agente causal del brote (Pérez y cols., 1999).

De las muestras remitidas para su estudio microbiológico, se aislaron colonias bacterianas de intestino, hígado, linfonodos mesentéricos y tonsila, identificadas como ***Salmonella enterica*** **serovar Enteritidis**, mediante pruebas bioquímicas descritas previamente (Volf y cols., 2012). El perfil tipo de fago fue 9,12: gm. Este es el primer caso de la forma esporádica de ***salmonelosis septicémica*** por *S. enterica* serovar Enteritidis en el CNC. Éste es un patógeno primario en aves, sin embargo en varios países de Europa, *S.* Enteritidis también está presente en explotaciones porcinas. *S.* Enteritidis no se adapta a un hospedador en particular, por lo que las infecciones pueden tener lugar entre distintas especies animales. Sólo se ha descrito un brote asociado a *S.* Enteritidis en una raza de porcino salvaje en peligro de extinción, en la India (Rahman y cols., 2001) y la principal diferencia en relación con el presente caso es que las lesiones presentes en los jabalíes sólo se observaron a nivel intestinal. Teniendo en cuenta el curso agudo de los signos clínicos, se puede concluir que *S.* Enteritidis fue una cepa lo suficientemente patógena e invasiva para este animal, observaciones coincidentes con un estudio experimental donde al parecer *S.* Enteritidis es más invasivo que *S.* Typhimurium (Volf y cols., 2012).

En este animal se detectó Mh mediante IHQ, conjuntamente con el aislamiento de *S.* Enteritidis, causante de un cuadro septicémico en este animal. Algunos autores proponen modelos de interacción en el desarrollo del PRDC donde participan un virus o *Mycoplasma* y agentes bacterianos "no respiratorios" (Iglesias y Trujano, 2000). Si bien *S.* Choleraesuis en un agente bacteriano de tipo entérico, resulta frecuente encontrarla en procesos respiratorios cuando se presenta la forma septicémica. Aunque no se ha descrito específicamente la coinfección entre Mh y *S.* Enteritidis, sí se referencia en varios trabajos la interacción entre PRRSv y *S.* Choleraesuis, donde al parecer la mortalidad causada por *Salmonella* spp. es mayor en cerdos que han sido infectados de forma natural o experimentalmente por

PRRSv (Wills y cols., 2000). Al igual que PRRSv, Mh es un agente patógeno inmunomodulador, por lo que sería factible que la presencia de Mh en el tracto respiratorio de este animal hubiera facilitado la acción patógena de *S.* Enteritidis a nivel pulmonar, provocando lesiones microscópicas a nivel pulmonar descritas en las salmonelosis (Iglesias y Trujano, 2000).

5.4.4 CASOS COMPATIBLES CON INFECCIÓN POR *HAEMOPHILUS PARASUIS.*

Otros cuatro animales presentaron serositis supurativa o fibrinosupurativa subaguda en varias localizaciones, incluyendo las articulaciones, conjuntamente con miocarditis y/o encefalitis supurativa. Estas lesiones de poliserositis-polisinovitis, coinciden con cuadros de infección por *H. parasuis* (Oliveira y Pijoan, 2004), aunque también podrían deberse a infección por *M. hyorhinis* o *Strep. suis* tipo 2 (Brown y cols., 2007) .

H. parasuis, junto con *M. hyorhinis* o *M. flocculare*, son unos de los agentes bacterianos que, con frecuencia, se encuentran formando parte de la flora normal del tracto respiratorio de cerdos sanos (Sorensen y cols., 2006). Bajo determinadas condiciones, actúan como bacteria oportunista y ejercen su acción patógena causando lesiones macroscópicas y microscópicas características de poliserositis fibrinopurulenta, artritis, meningitis, y bronconeumonía supurativa (Vahle y cols., 1995; Thompson, 2007). Recientemente, se han descrito lesiones macroscópicas y microscópicas similares en un jabalí de 5 meses de edad, habiéndose aislado *H. parasuis*, y confirmado posteriormente mediante PCR (Cuesta y cols., 2013).

Los animales con poliserositis observados en el presente estudio, presentaron a nivel pulmonar, lesiones únicas de bronconeumonía supurativa o en combinación con bronconeumonía fibrinonecrótica, confirmada microscópicamente, y en uno de los casos combinada con neumonía intersticial. En el desarrollo del PRDC, se considera que *H. parasuis* actúa como patógeno secundario (Brockmeier y cols., 2002; Bochev y cols., 2007). En coinfecciones con otros patógenos que comprometan el estado inmunitario del animal, pueden dar lugar a procesos sistémicos o agravar las lesiones causadas por estos; como se ha observado en estudios experimentales de coinfección entre *H. parasuis* y PRRSv (Solano y cols., 1997) o *H. parasuis* y PCV2 (Kim y cols., 2002), así con entre los tres agentes etiológicos, en condiciones naturales (Li y cols., 2009). Hansen y cols. (2010c), en un estudio del PRDC, detectaron la presencia de *H. parasuis* únicamente en aquellos animales que presentaban lesiones macroscópicas de bronconeumonía supurativa crónica, si bien la prevalencia de este patógeno fue muy baja.

Aunque se observaron lesiones características compatibles con infección por *H. parasuis*, asociadas a lesiones a nivel pulmonar que podrían indicar procesos de coinfección con Mh, PRRSv o PCV2, no fue posible detectar a ninguno de ellos mediante las técnicas de IHQ desarrolladas. De igual manera, para dar un diagnóstico definitivo de infección por *H. parasuis*, como principal agente patógeno causante de las poliserositis o polisinovitis observadas, habría sido necesario la realización de técnicas complementarias para la identificación del mismo.

Resumiendo, en el presente estudio se observó que la mitad de los animales analizados presentaron lesiones macroscópicas y microscópicas de severidad variable afectando al pulmón, pudiendo ser la causa de la muerte. En algunos casos, quedó demostrada la acción patógena de agentes víricos o bacterianos primarios involucrados en el desarrollo del PRDC, mediante su detección por IHQ, como fueron los casos de enfermedad asociadas a PCV2, los casos de PRRS y la detección de Mh.

Asimismo, quedó demostrada la participación de agentes secundarios que, en determinadas condiciones, causan cuadros de septicemia provocando lesiones también a nivel respiratorio. Fue posible la identificación de *S. enterica* serovar Enteritidis en salmonelosis septicémica con afectación pulmonar y en algunos casos se observaron hallazgos anatomopatológicos compatibles con infección por *H. parasuis*; sin embargo, en estos animales no fue posible dar un diagnostico etiológico definitivo.

Así, a pesar de ser una raza perfectamente adaptada al medio, el Cerdo Negro Canario, es susceptible de padecer enfermedades respiratorias descritas en el cerdo híbrido y en otras razas rústicas. Queda demostrado el desarrollo de inmunidad en estos animales frente a agentes patógenos involucrados en el PRDC, detectándose un mayor contacto con PCV2 y Mh. La presencia de lesiones, a nivel pulmonar, en animales sanos sacrificados en matadero; así como, la detección mediante IHQ de estos patógenos, puso en evidencia el desarrollo de infecciones subclínicas. Finalmente, la capacidad de producir enfermedad y causar la muerte de los animales, descrita para estos agentes primarios, así como para agentes secundarios (*Salmonella* spp. o *H. parasuis*), se hizo evidente en el estudio de casos donde el sistema respiratorio se vio seriamente afectado.

CONCLUSIONES

6.

6 CONCLUSIONES

Primera. La población de Cerdo Negro Canario está expuesta a los principales agentes etiológicos del Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas, en donde se establecen cuadros subclínicos y clínicos de distinta severidad y forma de presentación; habiéndose detectado la participación de patógenos bacterianos y víricos en infecciones puras o de forma conjunta.

Segunda. Mediante el estudio serológico se detectó anticuerpos principalmente frente PCV2 (evidenciando también infección activa), seguido de Mh y PRRSv. También, en más de la mitad de las explotaciones estudiadas se identificó la presencia de confecciones entre estos agentes patógenos, siendo más frecuente la participación conjunta de Mh, PCV2 y PRRSv, seguida por Mh y PCV2. Estas observaciones nos permiten conferir a Mh y PCV2 un papel importante en la patogénesis del PRDC en las explotaciones de Cerdo Negro Canario.

Tercera. La identificación de anticuerpos en extractos de tejido pulmonar mostró una buena correlación con los datos obtenidos a partir de suero sanguíneo en ELISA frente a PCV2 Y PRRSv, demostrando su potencial como muestras alternativa al análisis serológico.

Cuarta. En matadero, si bien se identificó un bajo porcentaje de lesiones macroscópica neumónicas, fue posible observar patrones histológicos de neumonía broncointersticial y neumonía intersticial de manera conjunta, lo que indica y refuerza la existencia de coinfecciones entre distintos patógenos respiratorios, hecho que pudimos confirmar utilizando las técnicas de IHQ.

Quinta. De los casos de muerte por causas naturales, se observó, mediante la realización de necropsias y estudio histopatológico, que más de la mitad de los animales presentaban lesiones pulmonares de bronconeumonía supurativa, neumonía broncointersticial y neumonía intersticial, solas o conjuntas. Estas bajas debidas al desarrollo del PRDC deberán tenerse en cuenta, como otro de los factores que pueden interferir en el mantenimiento y recuperación de la raza.

Sexta. La observación de sintomatología y patrones lesionales descritos para la enfermedad clínica asociada a PCV2, conjuntamente con un severo marcaje frente al antígeno viral, en varios órganos y principalmente en tejido linfoide, permitió diagnosticar una de las presentaciones más frecuentes asociadas a este virus como el PMWS. También se describió lesiones necrotizantes y hemorrágicas en piel y riñones asociadas al PDNS; siendo éstas las primeras descripciones del PMWS y PDNS en el Cerdo Negro Canario.

Séptima. La identificación de linfadenomegalia generalizada y neumonía intersticial, conjuntamente con la detección de inmunorreacción frente a Ags de PRRSv en macrófagos alveolares, así como en histiocitos y células dendríticas en tejido linfoide, nos permitió confirmar y describir por primera vez que PRRSv es capaz de causar infección y enfermedad en esta raza.

Octava. En relación a la participación de etiologías bacterianas identificadas por IHQ y/o aisladas en algunos cuadros respiratorios-entéricos, fue posible describir el primer caso de la forma de salmonelosis septicémica por *S. enterica* serovar Enteritidis asociada a Mh en el Cerdo Negro Canario.

RESUMEN

7 RESUMEN

El Cerdo Negro Canario (CNC) es la única raza porcina autóctona en Canarias, descrita por García y Capote en 1982. Son animales rústicos, bien adaptados al medioambiente y al clima de las islas. Se cree que deriva de otras poblaciones porcinas, dando origen a un grupo multirracial diferenciado de gran valor genético mundial, medioambiental y sociocultural. Actualmente está incluida en el Catálogo oficial de las Razas de Ganado de España (Real Decreto 1682/1997), como Raza Autóctona en Peligro de Extinción. En este contexto, para preservar el estándar racial, se ha creado un Libro Genealógico, conjuntamente con un Programa de conservación para su selección.

El CNC podría verse amenazado por el desarrollo de enfermedades ampliamente descritas en el cerdo híbrido, condicionando de esta manera su preservación y/o recuperación. El Complejo de Enfermedades Respiratorias del Porcino (PRDC) es considerado en la actualidad como uno de los principales problemas de salud que afectan a las explotaciones porcinas en todo el mundo. Su presentación es multifactorial y va a estar influenciada por la participación de numerosos agentes etiológicos que participan en la patogénesis, así como por las condiciones ambientales, de manejo y factores genéticos. Afecta a animales de 14-22 semanas de edad, produciendo disminución de peso y eficacia de la conversión alimentaria, anorexia, letargia, fiebre, tos y disnea; observándose rangos de morbilidad del 10-40% y mortalidad del 2-10%.

Los patógenos involucrados en el desarrollo del PRDC suelen ser agentes víricos primarios (virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRSv), Circovirus porcino tipo 2 (PCV2), virus de la peste porcina clásica, virus de Influenza porcina, virus de la enfermedad de Aujeszky, virus de la Pseudorrabia o Torqueteno virus), agentes bacterianos primarios (*Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) o *Actinobacillus pleuropneumoniae*) y agentes bacterianos secundarios (*M. hyorhinis, Pasteurella multocida o Haemophilus parasuis,* entre otras. El PRDC se ha descrito como una neumonía enzoótica, donde la acción de Mh se ve agravada por virus respiratorios y bacterias oportunistas. Macroscópicamente es frecuente observar bronconeumonía supurativa con áreas de consolidación craneoventral, pálidas grisáceas y atelectásicas. Microscópicamente, se puede presentar neumonía broncointersticial, con exudado en vías aéreas y luz alveolar, infiltrado inflamatorio peribronquial y peribronquiolar, hiperplasia del tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT), en ocasiones acompañadas por infiltrado inflamatorio en paredes alveolares e hiperplasia de neumocitos tipo II, dependiendo de los agentes etiológicos involucrados.

El conocimiento de los problemas de salud en la población porcina mundial, como una de las misiones de la OIE, representa uno de los aspectos básicos para el control y prevención de las enfermedades. Dada la importancia del PRDC, nos planteamos, **conocer la situación epidemiológica del PRDC en CNC y la participación de Mh, PRRSv y PCV2 como agentes patógenos utilizando diferentes métodos de diagnóstico.**

En el presente trabajo, se realizó necropsia a 25 ejemplares (2007 a 2012), para estudiar las causas de muerte más frecuentes, identificando aquellas asociadas a enfermedades respiratorias. Además, se realizó estudio en matadero en 30 ejemplares sanos, analizando tejido pulmonar y otros órganos (linfoides, renal y hepático) por los cuales tienen tropismo los patógenos involucrados en el PRDC, para evaluar el desarrollo de cuadros subclínicos de enfermedades respiratorias. Y por último, se determinó la prevalencia, mediante análisis serológicos, para cada uno de estos agentes en 329 ejemplares de CNC pertenecientes a 35 explotaciones.

En los casos de necropsias y en los tejidos procedentes de animales sacrificados en matadero, se llevó a cabo un diagnóstico anatomopatógico, así como inmunohistoquímico (IHQ), para la detección de Mh, PRRSv y PCV2. Mediante serología, se analizó la presencia de anticuerpos (Acs) frente a Mh, PRRSv y PCV2, empleando kits de comerciales de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA). Además, se evaluó la viabilidad de los extractos de tejido pulmonar, como muestra alternativa al suero sanguíneo para la detección de anticuerpos frente a Mh, PRRSv y PCV2 mediante ELISA.

En la población de CNC analizada fue posible detectar Acs frente a Mh (11,2%), PRRSv (4%) y PCV2 (57%), detectándose infección activa o reciente por PCV2 en un 5% de los animales. Se observó coinfección entre estos patógenos en el 51% de las explotaciones analizadas, siendo más frecuente la participación conjunta de Mh, PCV2 y PRRSv (25%), seguida por Mh y PCV2 (20%). Solo fue posible observar coinfección entre Mh y PRRSv en un 3% de las explotaciones.

En relación a los extractos pulmonares, se observó una buena correlación entre los resultados obtenidos con extractos pulmonares y suero sanguíneo en el ELISA frente a PCV2 y PRRSv, indicando que ésta podría ser una buena muestra alternativa en la realización de técnicas de ELISA.

En el estudio en matadero, se observó macroscópicamente, bronconeumonía supurativa (10%), detectándose a nivel microscópico, neumonía broncointersticial (47%) e hiperplasia del BALT (77%) compatibles con infección por Mh, neumonía intersticial (67%) compatibles con infecciones víricas y la combinación de éstas (37%). Mediante IHQ fue posible la detección de Mh en un 50% de los animales. En los otros órganos evaluados se observó hepatitis fibrosa parasitaria y nefritis intersticial, macroscópicamente, confirmándose a nivel microscópico la presencia de hepatitis fibrosa eosinofílica de origen parasitario (*Ascaris* suum), y nefritis intersticial compatible con infecciones víricas. En órganos linfoides se observó, principalmente, depleción linfoide o hiperplasia linfoide reactiva. Mediante IHQ sólo fue posible detectar PCV2 en tejido linfoide y riñón (7%).

En cuanto a las causas de muerte asociadas a cuadros respiratorios en esta raza, se observaron lesiones macroscópicas de tipo inflamatorio a nivel pulmonar en un 54% de los animales, describiéndose principalmente bronconeumonía supurativa (43%), neumonía intersticial (21%) o la combinación de ambas. Microscópicamente se observó bronconeumonía purulenta, neumonía broncointersticial y neumonía intersticial y ocasionalmente, bronconeumonía fibrinopurulenta. Mediante IHQ fue posible detectar la presencia de Mh (7%), PRRSv (14%) y PCV2 (14%). Por la clínica presentada, las lesiones macroscópicas y microscópicas observadas y la detección del agente patógeno, fue posible describir casos de enfermedad asociadas a PCV2 (Síndrome Multisistémico de Adelgazamiento Post-destete (PMWS) y de Dermatitis y Nefropatía Porcina (PDNS)) y casos de Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS). También se observó coinfección entre Mh y *Salmonella* sp. identificada mediante estudio microbiológico, en un caso de salmonelosis septicémica con afectación pulmonar. Además se describieron casos compatibles con infección por *Haemophilus parasuis,* aunque no fue posible dar un diagnostico etiológico definitivo.

Queda demostrado el desarrollo de inmunidad en estos animales frente a agentes patógenos involucrados en el PRDC, detectándose un mayor contacto con PCV2 y Mh. La presencia de lesiones, a nivel pulmonar, en animales sanos sacrificados en matadero; así como, la detección mediante IHQ de estos patógenos, puso en evidencia el desarrollo de infecciones subclínicas. Finalmente, la capacidad de producir enfermedad y causar la muerte de los animales, descrita para estos agentes primarios, así como para agentes secundarios (*Salmonella* spp. o *H. parasuis*), se hizo evidente en el estudio de casos donde el sistema respiratorio se vio seriamente afectado.

SUMMARY

8 SUMMARY

The Canary Black Pig (CBP) is the only native pig breed in the Canary Islands, described by Garcia and Capote in 1982. They are rustic animals, well adapted to the environment and climate of the Islands. It is believed that derives from other pig populations, giving rise to a multiracial group of great importance within the world's genetic heritage, environmental and socio-cultural value. It is currently included in the Official Catalog of the Livestock Breeds of Spain, as Specially-Protected Local Breed Endangered (RD 1682/1997). For preserve the racial standard, a Studbook and active conservation programme of the breed was created.

The CBP may be threatened by the development of widely described diseases in pig crossbreed, conditioning the recovery of this endangered breed. Porcine Respiratory Diseases Complex (PRDC) is currently considered wordwide as one of the main health problems affecting pig farms. This syndrome is the result of the interaction between numerous etiological agents involved in the pathogenesis, the immune status of the host and the environment. PRDC affects pigs from 14-22 weeks of age and is characterized by slow growth, decreased feed efficiency, lethargy, anorexia, fever, cough, and dyspnea. Morbidity ranges from 10% to 40% and mortality from 2% to 20%.

The pathogens involved in the development of the PRDC are typically classified as primary viral agents (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSv), Porcine circovirus type 2 (PCV2), Classical swine fever virus, Swine influenza virus, Aujeszky disease virus, Pseudorabia virus or Torqueteno virus), primary bacterial agents (*Mycoplasma hyopneumoniae* or *Actinobacillus pleuropneumoniae*) and secondary bacterial agents (*Mycoplasma hyorhinis, Pasteurella multocida* or *Haemophilus parasuis*, among others). The PRDC has been described as an enzootic pneumonia, where the pathogenic action of Mh is aggravated by respiratory viruses and opportunistic bacteria. Pathological findings may vary according to the pathogens involved. Gross lesions are primarily located in the cranioventral areas of the lung, where consolidation, discoloration and failure of the lung tissue to collapse may be observed. Microscopically, bronchopneumonia, sometimes in combination with interstitial pneumonia is often reported, characterized by presence of exudates within airways and alveolar spaces, peribronchial and peribronchioliolar inflammatory infiltration, and bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) hyperplasia, occasionally in combination with infiltration of alveolar septae with monocytes and of type II pneumocytes hyperplasia.

Knowledge of health problems in the swine population, as one of the missions of the OIE, represents one of the basic aspects for the control and prevention of diseases. Considering the importance of the PRDC, the main objective of the present study was to value the epidemiologic situation of the PRDC for CNC and the participation of Mh, PRRSv and PCV2 as pathogenic agents using different diagnosis methods.

Necropsy to 25 animals (2007 to 2012) was performed, to study the causes of death more frequent, identifying those associated to respiratory diseases. In addition, 30 healthy individuals was studied at slaughter, analyzing lung and other tissues (lymphoid, renal and hepatic) for which the pathogens involved in the PRDC have tropism, to evaluate the development of subclinical respiratory disease. Finally, the prevalence for each pathogenic agents in 329 sera samples of animals in 35 herds was determined.

Pathological diagnosis of the lesions, as well as immunohistochemical studies (IHC), for the detection of Mh, PRRSv and PCV2 was performed, in those animals who were necropsied and tissues of slaughtered animals. Antibodies against PRRS, PCV2 and Mh were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) comercial kits. In addition, the viability of extracts of lung tissue, as an alternative to blood serum for the detection of antibodies to Mh, PRRSv and PCV2 by ELISA, were evaluated.

Titres of antibodies against Mh were found in 11.2% of analyzed sera samples, only 4% was positive for PRRSv and 57% were positive for IgG against PCV2 (late infection). Early infection of PCV2 was observed at 5% of analyzed serum samples. Fifty-one percent of herds showed coinfection between these pathogens, being more frequent co-participation of Mh , PCV2 and PRRSV (25%), followed by Mh and PCV2 (20 %). It was only possible to observe coinfection between Mh and PRRSV in 3% of herds.

As regards to lung extracts, it was observed a good correlation between the results obtained by those and blood serum using ELISA commercial kits against PCV2 and PRRSv, indicating that this could be a good alternative sample in performing of ELISA techniques.

The main pathological findings observed in slaughtered animals were, macroscopically, a suppurative bronchopneumonia (10%), detecting microscopically, broncointersticial pneumonia (47%) and BALT hyperplasia (77%) compatible with Mh infection, as well as interstitial pneumonia (67%) compatible with viral infections and the combination of them (37%). By IHC, detection of Mh was possible in 50% of animals. In other tissues evaluated were observed gross lesions of parasitic fibrous hepatitis and interstitial nephritis. The presence of parasitic eosinophilic fibrous hepatitis (Ascaris suum) and interstitial nephritis viral infections-compatible were confirmed microscopically. Lymphoid tissues mainly showed lymphoid depletion or reactive lymphoid hyperplasia. By IHC, it was only possible to detect PCV2 in kidney (7%) and lymphoid tissue (7%).

Regards to causes of death associated with respiratory symptoms in this breed, gross inflammatory lesions in lungs were observed in 54% of animals, mainly describing suppurative bronchopneumonia (43%), interstitial pneumonia (21%) or combination of them. Microscopically, purulent bronchopneumonia, bronchointerstitial pneumonia and interstitial pneumonia, and occasionally fibrinopurulent bronchopneumonia was observed. By IHC was possible to detect the presence of Mh (7%), PRRSV (14%) and PCV2 (14%). Based on the clinical signs, gross and microscopic lesions and the detection of the pathogen, it was possible to describe cases of PCV2-associated diseases (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS)) and cases of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). Coinfection between Mh and Salmonella sp, identified by microbiological study, was also observed, in a case of septicemic salmonellosis with pulmonary involvement. Besides cases compatible with *H. parasuis* were described, although it was not possible to give a definitive etiologic diagnosis.

According to the results, we conclude that, although Black Canary Pig is a breed perfectly adapted to the environment, is susceptible to respiratory diseases described in the crossbreeds pigs, like other rustic breeds. The development of immunity in these animals against pathogens involved in PRDC is demonstrated, detecting more contact with PCV2 and Mh. The presence of lesions in the lungs in healthy animals slaughtered, as well as the detection of these pathogens, by IHC, suggest the development of subclinical infections. Finally, the ability to produce disease and cause death of animals, described for these primary pathogens, as well as secondary agents (*Salmonella* sp. or *H. parasuis*), it became clear in the study of cases where the respiratory system was seriously affected.

ABREVIATURAS

9.

9 ABREVIATURAS

µl, microlitro.
µm, micrómetro.
ABP, complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa.
Ac/Acs, anticuerpo/s.
ACCNC, Asociación de Criadores de Cochino Negro Canario.
AcMs, anticuerpos monoclonales.
AcPs, anticuerpos policlonales.
ADN, ácido desoxirribonucleico.
ADV, virus de la enfermedad de Aujeszky (*Aujeszky disease virus*).
AEC, 3-amino-9-etilcarbazol.
Ag/Ags, antígeno/s.
App, *Actinobacillus pleuroneumoniae.*
ARN, ácido ribonucleico.
BALT, tejido linfoide asociado a los bronquios (*bronchus-associated lymphoid tissue*).
C, animal de cebo.
C-, control negativo.
C+, control positivo.
cfm, pies cúbicos por minuto (c*ubic feet per minute*).
CGMN, células gigantes multinucleadas.
CID, coagulopatía intravascular diseminada.
CII, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos.
CNC, Cerdo negro canario.
CSFv, vírus de La peste porcina clásica (*Classical swine fever virus*).
CT, Temblor congénito (*congenital tremor*).
DO, densidad óptica.
dpi, días post-infección.
ELISA, Inmunoensayo ligado a enzima (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).
EP, extracto de tejido pulmonar.
FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations.*
FC, fijación del complemento.
FMIA, *Fluorescent microsphere immunoassay.*
G, galga.
GC, Gran Canaria.
GMD, ganancia media diaria.
H&E, hematoxilina-eosina.
HAI, prueba de hemaglutinación indirecta.
ID, identificación.
IFA, inmunofluorescencia indirecta (*indirect immunofluorescence antibody assay*).
Ig, inmunoglobulina.
IgG, inmunoglobulina G.
IgM, inmunoglobulina M.
IGSS, Inmuno-tinción de oro y plata (*Immuno gold silver staining*).
IHQ, inmunohistoquímica.
IPMA, ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa (*Immunoperoxidase monolayer assay*).
ISH, hibridación in situ (*In situ hybridization*).
IT, índice de transformación.
L, lechón.
LG, Libro genealógico.
LN, linfonodo.
LNTb, linfonodo traqueobronquial.
LP, La Palma.
LTALT, tejido linfoide asociado a la laringe y tráquea (*trachea and larynx-associated lymphoid tissue*).
LZT, Lanzarote.
MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
MALT, tejido linfoide asociado a la mucosa (*mucosa-associated lymphoid tissue*).
mg, miligramo.
Mh, *Mycoplasma hyopneumoniae.*
MHC, complejo mayor de histocompatibilidad (*mayor histocompatibility complex*).
ml, mililitro.
mm, milímetro.
NALT, tejido linfoide asociado a la cavidad nasal (*nose-associated lymphoid tissue*).
NEP, Neumonía Enzoótica Porcina.
NK, *Natural Killer.*
nm, nanómetro.
ºC, grado centígrado.
OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal.
ORF, marco de lectura abierta (*open reading frame*).
PAMs, macrófagos alveolares pulmonares (*pulmonary alveolar macrophages*).
PAP, técnica peroxidasa anti-peroxidasa.
pb, pares de bases.
PBS, fosfato buffer salino.
PC, punto de corte.
PCMv, *Citomegalovirus porcino* (*Porcine Cytomegalovirus*).
PCR, reacción de polimerasa en cadena (*polymerasa chain reaction*).
PCV, Circovirus porcino (*Porcine circovirus*).
PCV2, Circovirus porcino tipo 2 (*Porcine circovirus type 2*).
PCV2-ED, enfermedad entérica o enteritis por circovirus porcino tipo 2 (*PCV2-enteric disease*).
PCV2-LD, enfermedad respiratoria por circovirus porcino tipo 2 (*PCV2-lung disease*).
PCV2-RD, enfermedad o fallo reproductivo por circovirus porcino tipo 2 (*PCV2-reproductive disease*).
PCV2-SD, enfermedad sistémica por circovirus porcino tipo 2 (*PCV2-systemic disease*).
PCV2-SI, infección subclínica por circovirus porcino tipo 2 (*PCV2-subclinical infection*).
PCVAD, enfermedad asociada a circovirus porcino (*Porcine Circovirus Associated Disease*).
PCVD, enfermedad clínica por PCV2 (*Porcine circovirus disease*).
PDNS, Síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (*Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*).
PEARS, síndrome respiratorio y aborto epidémico porcino (*Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome*).

PIMs, macrófagos alveolares intravasculares (*pulmonary intravascular macrophages*).
PMWS, Síndrome multisistémico de adelgazamiento post destete *(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome).*
PNP, neumonía proliferativa necrotizante (*Proliferative and necrotising Pneumonia*).
PPC, Peste porcina clásica.
PRCv, Coronavirus respiratorio porcino (*Porcine respiratory coronavirus*).
PRDC, Complejo de enfermedades respiratorias porcinas (*Porcine Respiratory Disease Complex*).
PRRS, Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*).
PRRSv, virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus*).
PRv, virus de la Pseudorrabia (*Pseudorabia virus*).
R, reproductor.
RGAD, Recursos genéticos de animales domésticos.
rpm, revoluciones por minuto.
RT, tiempo real (*real time*).
SBP, complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa
SBP, Streptavidina-Biotina-Peroxidasa.
SIRS, síndrome respiratorio y de infertilidad porcino (*Swine Infertility and Respiratory Syndrome*).
SIv, virus de Influenza porcina (*Swine influenza virus*).
SLA, antígenos leucocitarios porcinos (*Swine Leucocyte Antigens*).
SNC, Sistema Nervioso Central.
SP, proteína surfactante *(surfactant protein).*
SPF, libres de agentes patógenos específicos (*specific pathogen free*).
spi, semana post-infección.
SRRS, síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (*Swine Reproductive and Respiratory Syndrome*).
TF, Tenerife.
TTv, Torque teno virus.
vs, *versus.*
WBI, inmunoensayo Western blot (*Western blot immunoassay*).

ANEXOS

10.

10 ANEXOS

10.1 SEROLOGÍA EN GRAN CANARIA

Tabla 20: DO de las distintas muestras para el ELISA frente a Mh, PRRVs y PCV2 (IgG/IgM) en función de las distintas categorías evaluadas en cada explotación de Gran Canaria. Indicando, para las distintas categorías (r Reproductores, l Lechones y c Cebo), en rojo los valores de DO positivos y negro los negativos. En la serología de PCV2 aparecen sombreados en amarillo aquellos animales con Infección Reciente (uno o dos meses) (DO de IgG > IgM, siendo DO de IgM positiva) y en naranja aquellos con Infección Activa (DOs de IgM>IgG, siendo los valores de DO positivos).

ID Exp	ID Anim	Mh	PRRSv	PCV2	
				IgG	IgM
GC1	GC1 r1	0,48	0,23	0,66	0,21
	GC1 r2	0,57	0,23	0,33	0,18
	GC1 l1	0,49	0,12	0,17	0,20
	GC1 l2	0,49	0,12	0,18	0,06
	GC1 l3	0,43	0,16	0,23	0,25
	GC1 l4	0,47	0,13	0,16	0,35
GC2	GC2 r1	0,56	0,15	0,59	0,20
	GC2 r2	0,57	0,16	1,45	0,24
	GC2 r3	0,48	0,14	0,86	0,08
	GC2 r4	0,57	0,15	0,59	0,22
	GC2 r5	0,46	0,15	1,67	0,23
	GC2 r6	0,42	0,14	0,17	0,21
	GC2 r7	0,47	0,18	0,19	0,24
	GC2 r8	0,65	0,08	2,06	0,20
	GC2 r9	0,53	0,08	0,15	0,20
	GC2 r10	0,58	0,35	0,79	0,50
	GC2 r11	0,40	0,09	0,16	0,25
	GC2 l1	0,83	0,08	0,16	0,18
	GC2 l2	0,61	0,14	0,17	0,23
	GC2 l3	0,65	0,08	0,16	0,14
	GC2 l4	0,76	0,11	0,15	0,16
	GC2 l5	0,53	0,08	0,16	0,16
	GC2 c1	0,61	0,15	1,85	0,26
GC3	GC3 r1	0,47	0,38	0,31	0,23
	GC3 r2	0,38	0,15	1,40	0,31
	GC3 r3	0,45	0,15	1,22	0,28
	GC3 r4	0,48	0,15	1,48	0,37
	GC3 r5	0,45	0,16	1,24	0,08
	GC3 r6	0,46	0,18	0,61	0,58
	GC3 r7	0,45	0,22	0,62	0,20
	GC3 r8	0,48	0,18	1,06	0,32
	GC3 r9	0,57	0,24	0,28	0,35
	GC3 r10	0,87	0,17	0,84	0,18
	GC3 r11	0,46	0,16	1,52	0,31
	GC3 r12	0,80	0,12	1,94	0,33
	GC3 r13	0,48	0,18	0,34	0,25
	GC3 r14	0,37	0,26	1,32	0,33
	GC3 r15	0,56	0,17	1,31	0,07
	GC3 r16	0,44	0,15	2,01	0,35
	GC3 r17	0,46	0,17	1,86	0,29
	GC3 r18	0,72	0,24	1,13	0,20
	GC3 r19	0,47	0,27	0,92	0,26
	GC3 r20	0,82	0,13	0,33	0,16
	GC3 r21	0,70	0,11	2,17	0,39
	GC3 l1	1,00	0,12	0,40	0,25
	GC3 l2	0,92	0,14	0,34	0,21

Tabla 20: Continuación.

GC3 continuación	GC3 l3	1,04	0,10	0,43	0,18
	GC3 l4	0,88	0,11	0,32	0,17
	GC3 l5	0,96	0,14	0,41	0,22
	GC3 l6	0,89	0,11	0,29	0,22
	GC3 l7	0,92	0,13	0,56	0,20
	GC3 l8	0,89	0,13	0,47	0,21
	GC3 l9	1,00	0,14	0,34	0,23
	GC3 l10	0,77	0,11	0,59	0,19
	GC3 l11	0,85	0,13	0,56	0,20
	GC3 l12	0,97	0,14	0,28	0,20
	GC3 l13	0,94	0,17	0,28	0,26
	GC3 l14	0,91	0,15	0,46	0,21
	GC3 l15	0,84	0,08	0,17	0,21
	GC3 l16	0,57	0,08	0,17	0,20
	GC3 l17	0,84	0,07	0,15	0,18
	GC3 l18	0,88	0,07	0,19	0,42
	GC3 l19	0,63	0,08	0,18	0,19
	GC3 l20	0,72	0,09	0,17	0,21
	GC3 l21	0,66	0,07	0,16	0,33
	GC3 l22	0,62	0,08	0,17	0,17
	GC3 l23	0,63	0,07	0,17	0,20
	GC3 l24	0,83	0,08	0,17	0,23
	GC3 c1	0,91	0,16	0,54	0,19
	GC3 c2	0,75	0,14	1,92	0,29
	GC3 c3	0,80	0,14	1,53	0,22
	GC3 c4	0,81	0,12	1,76	0,45
	GC3 c5	0,83	0,15	1,48	0,22
	GC3 c6	0,79	0,13	1,73	0,23
	GC3 c7	0,91	0,13	1,61	0,26
	GC3 c8	0,99	0,30	1,80	0,52
	GC3 c9	0,83	0,15	1,56	0,27
GC4	GC4 r1	0,59	0,12	0,48	0,25
	GC4 r2	0,30	0,18	0,25	0,34
	GC4 r3	0,49	0,34	0,35	0,06
	GC4 r4	0,44	0,13	1,43	0,34
	GC4 r5	0,47	0,10	1,00	0,25
	GC4 r6	0,48	0,13	1,51	0,26
	GC4 l1	0,46	0,13	0,20	0,23
	GC4 c1	0,42	0,17	0,17	0,08
	GC4 c2	0,64	0,14	0,16	0,19
	GC4 c3	0,45	0,14	0,16	0,24
	GC4 c4	0,49	0,13	0,17	0,24

Mh. Muestras positivas: muestras con valores de DO menores al PC +. Muestras negativas: muestras con valores de DO mayores al PC -. **PRRSv.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC. **PCV2.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC.

			PCV2	
	Mh	**PRRSv**	**IgG**	**IgM**
DO C+	0,21	2,54	1,61	1,25
DO C-	1,23	0,23	0,16	0,22
PC +	**0,49**	**0,38**	**0,48**	**0,50**
PC -	**0,55**			

Tabla 20: Continuación.

GC5	GC5 r1	0,58	0,08	0,79	0,28
	GC5 r2	0,80	0,10	1,38	0,31
	GC5 r3	0,52	0,13	0,47	0,29
	GC5 r4	0,75	0,11	0,45	0,38
	GC5 r5	0,70	0,13	0,37	0,34
	GC5 r6	0,55	0,11	0,91	0,30
	GC5 r7	0,72	0,53	1,96	0,34
	GC5 r8	0,57	0,09	0,94	0,37
	GC5 r9	0,65	0,23	1,77	0,35
	GC5 r10	0,56	0,10	0,56	0,46
	GC5 r11	0,55	0,14	0,72	0,33
	GC5 r12	0,60	0,19	0,78	0,29
	GC5 r13	0,59	0,09	0,78	0,33
	GC5 r14	0,37	0,21	0,46	0,57
	GC5 r15	0,67	0,12	0,86	0,35
	GC5 r16	0,65	0,11	0,31	0,32
	GC5 r17	0,48	0,13	0,75	0,30
	GC5 r18	0,49	0,10	1,13	0,25
	GC5 r19	0,49	0,09	0,32	0,26
	GC5 r20	0,51	0,08	0,58	0,32
	GC5 r21	0,80	0,07	0,47	0,27
	GC5 r22	0,81	0,12	1,31	0,39
	GC5 r23	0,77	0,08	0,31	0,48
	GC5 r24	0,59	0,10	0,31	0,23
	GC5 r25	0,87	0,08	0,34	0,28
	GC5 r26	0,71	0,11	1,26	0,43
	GC5 r27	0,88	0,11	1,18	0,39
	GC5 r28	0,80	0,08	1,43	0,38
	GC5 r29	0,67	0,08	1,32	0,35
	GC5 r30	0,70	0,08	1,21	0,37
	GC5 r31	0,67	0,08	1,07	0,30
	GC5 r32	0,52	0,07	0,83	0,19
	GC5 r33	0,48	0,09	0,78	0,33
	GC5 l1	0,85	0,18	0,18	2,05
	GC5 l2	0,81	0,10	0,18	0,21
	GC5 l3	0,65	0,13	0,67	0,23
	GC5 l4	0,75	0,10	0,20	0,22
	GC5 l5	0,84	0,21	1,64	1,45
	GC5 l6	0,96	0,08	0,20	0,24
	GC5 l7	0,79	0,09	0,80	0,94
	GC5 l8	0,82	0,09	0,24	0,26
	GC5 l9	0,74	0,08	0,75	1,41
	GC5 l10	0,88	0,06	1,43	1,92
	GC5 l11	0,88	0,09	0,19	0,23
	GC5 l12	0,64	0,09	1,83	1,87
	GC5 l13	0,76	0,11	0,19	0,83
	GC5 l14	0,67	0,09	0,23	0,19
	GC5 l15	0,74	0,13	0,41	0,21
	GC5 l16	0,87	0,12	0,24	0,23
	GC5 l17	0,63	0,04	0,24	0,19
	GC5 l18	0,72	0,12	0,59	0,19
	GC5 l19	0,89	0,10	0,24	0,22
	GC5 l20	0,68	0,09	0,47	0,18
	GC5 l21	0,86	0,12	0,22	0,22
	GC5 l22	0,82	0,10	0,49	0,18
	GC5 l23	0,73	0,09	0,20	0,21
	GC5 l24	0,71	0,09	0,20	0,20
	GC5 l25	0,80	0,07	0,16	0,19
	GC5 l26	0,89	0,09	0,64	1,93
	GC5 l27	0,83	0,07	0,75	0,22
	GC5 l28	0,91	0,07	1,12	0,16
	GC5 l29	0,81	0,07	0,79	0,21

Tabla 20: Continuación.

GC5 continuación	GC5 c1	0,78	0,11	2,08	0,32
	GC5 c2	0,75	0,11	1,87	0,38
	GC5 c3	0,79	0,11	1,94	0,31
	GC5 c4	0,69	0,12	1,85	0,26
	GC5 c5	0,88	0,11	1,70	0,31
	GC5 c6	0,80	0,09	1,35	0,27
	GC5 c7	0,69	0,10	1,40	0,27
	GC5 c8	0,64	0,10	1,91	0,28
	GC5 c9	0,90	0,09	1,57	0,26
	GC5 c10	0,56	0,11	1,87	0,70
	GC5 c11	0,80	0,09	1,97	0,34
	GC5 c12	0,92	0,11	2,07	0,31
	GC5 c13	0,64	0,12	1,80	0,30
	GC5 c14	0,84	0,09	1,28	0,27
	GC5 c15	0,81	0,11	1,84	0,56
	GC5 c16	0,87	0,17	1,58	0,22
	GC5 c17	0,97	0,15	1,27	0,27
	GC5 c18	0,76	0,17	1,55	0,31
	GC5 c19	0,93	0,08	1,58	0,26
	GC5 c20	0,32	0,07	1,93	0,27
	GC5 c21	0,67	0,12	2,16	0,32
	GC5 c22	0,65	0,07	2,03	0,78
	GC5 c23	0,64	0,07	1,12	0,20
	GC5 c24	0,73	0,08	1,88	0,36
	GC5 c25	0,78	0,09	1,18	0,98
	GC5 c26	0,68	0,07	1,86	0,40
	GC5 c27	0,66	0,13	1,92	0,34
	GC5 c28	0,69	0,09	2,11	0,30
	GC5 c29	0,54	0,07	1,99	0,35
	GC5 c30	0,64	0,08	1,62	0,30
	GC5 c31	0,55	0,07	1,91	0,34
	GC5 c32	0,57	0,08	1,90	0,21
	GC5 c33	0,54	0,08	2,10	0,32
	GC5 c34	0,39	0,09	1,64	0,24
	GC5 c35	0,87	0,10	2,04	0,29
	GC5 c36	0,74	0,08	2,01	0,41
	GC5 c37	0,63	0,08	1,47	0,22
	GC5 c38	0,76	0,08	1,96	0,29

Mh. Muestras positivas: muestras con valores de DO menores al PC +. Muestras negativas: muestras con valores de DO mayores al PC -. **PRRSv.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC. **PCV2.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC.

			PCV2	
	Mh	**PRRSv**	**IgG**	**IgM**
DO C+	0,16	2,00	1,91	2,00
DO C-	1,01	0,10	0,18	0,21
PC +	**0,40**	**0,30**	**0,57**	**0,80**
PC -	**0,45**			

Tabla 20: Continuación

GC6	GC6 r1	0,48	0,09	0,77	0,20
	GC6 r2	0,84	0,11	0,23	0,23
	GC6 r3	0,84	0,08	1,27	0,23
	GC6 r4	0,55	0,08	0,19	0,30
	GC6 r5	0,63	0,09	0,19	0,21
	GC6 r6	0,50	0,09	0,28	0,40
	GC6 r7	0,65	0,09	1,65	0,41
	GC6 r8	0,68	0,09	0,35	0,19
	GC6 r9	0,69	0,09	0,36	0,21
	GC6 r10	0,93	0,08	1,09	0,40
	GC6 r11	0,37	0,08	0,16	0,32
	GC6 l1	0,33	0,14	0,22	0,24
	GC6 l2	0,96	0,10	0,25	0,21
	GC6 l3	0,87	0,09	0,17	0,21
	GC6 l4	0,75	0,10	0,14	0,21
	GC6 l5	0,57	0,08	0,16	0,21
	GC6 l6	0,71	0,11	0,15	0,24
	GC6 l7	0,79	0,08	0,14	0,20
	GC6 l8	0,89	0,07	0,15	0,50
	GC6 l9	0,39	0,08	0,15	0,17
	GC6 l10	0,88	0,14	0,13	0,24
GC7	GC7 r1	0,72	0,08	1,06	0,38
	GC7 r2	0,76	0,09	0,39	0,24
	GC7 l1	1,07	0,14	0,15	0,16
	GC7 l2	0,99	0,09	0,16	0,14
	GC7 l3	1,06	0,09	0,73	0,71
	GC7 l4	1,03	0,10	0,74	0,70
	GC7 l5	1,04	0,13	0,17	0,18
	GC7 l6	0,97	0,14	0,15	0,17
	GC7 l7	1,04	0,11	0,14	0,19
	GC7 l8	1,08	0,23	0,13	0,53
	GC7 l9	0,88	0,08	0,18	0,22
	GC7 c1	0,77	0,09	0,14	0,25
	GC7 c2	0,68	0,08	0,13	0,30
GC8	GC8 r1	0,33	0,36	0,60	0,34
	GC8 r2	0,73	0,21	1,38	0,27
GC9	GC9 r1	0,75	0,08	2,08	0,51
	GC9 r2	0,61	0,13	2,12	0,32
GC10	GC10 r1	0,48	0,08	0,16	0,47
	GC10 r2	0,87	0,08	0,16	0,25

Mh. Muestras positivas: muestras con valores de DO menores al PC +. Muestras negativas: muestras con valores de DO mayores al PC -. **PRRSv.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC. **PCV2.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC.

			PCV2	
	Mh	**PRRSv**	**IgG**	**IgM**
DO C+	0,16	2,00	1,91	1,75
DO C-	1,01	0,10	0,18	0,18
PC +	**0,40**	**0,30**	**0,57**	**0,70**
PC -	**0,45**			

10.1.1 SEROLOGÍA LONGITUDINAL EN GRAN CANARIA

Tabla 21: DOs obtenidas para los 32 reproductores en las dos serologías realizadas frente a Mh, PRRSv y PCV2. Indicando, para categoría de reproductores (r), en rojo los valores de DO positivos y negro los negativos. En la serología de PCV2 quedarían sombreados en amarillo aquellos animales con Infección Reciente (uno o dos meses) (DO de IgG > IgM, siendo DO de IgM positiva) y en naranja aquellos con Infección Activa (DOs de IgM>IgG, siendo los valores de DO positivos).

ID Explot.	ID Anim.	Mh		PRRSv		PCV2 (IgG)		PCV2 (IgM)	
		1ª Ser.	2ª Ser.	1ª Ser.	2ª Ser.	1ª Ser.	2ª Ser.	1ª Ser.	2ª Ser.
GC2**	GC2 r1	0,56	0,35	0,15	0,07	0,59	0,93	0,20	0,19
	GC2 r2	0,57	0,14	0,16	0,08	1,45	1,68	0,24	0,25
	GC2 r3	0,48	0,41	0,14	0,08	0,86	1,25	0,08	0,19
	GC2 r5	0,46	0,65	0,15	0,08	1,67	2,05	0,23	0,20
	GC2 r7	0,47	0,52	0,18	0,08	0,19	0,17	0,24	0,22
GC3**	GC3 r2	0,38	0,58	0,15	0,07	1,40	1,51	0,31	0,25
	GC3 r3	0,45	0,61	0,15	0,11	1,22	1,50	0,28	0,27
	GC3 r4	0,48	0,52	0,15	0,07	1,48	1,97	0,37	0,43
	GC3 r5	0,45	0,61	0,16	0,08	1,24	1,51	0,08	0,19
	GC3 r8	0,48	0,70	0,18	0,08	1,06	1,12	0,32	0,21
	GC3 r9	0,57	0,38	0,24	0,09	0,28	0,95	0,35	0,15
	GC3 r12	0,80	0,65	0,12	0,08	1,94	1,93	0,33	0,41
	GC3 r13	0,48	0,70	0,18	0,09	0,34	0,40	0,25	0,16
	GC3 r14	0,37	0,50	0,26	0,09	1,32	1,75	0,33	0,32
	GC3 r16	0,44	0,66	0,15	0,08	2,01	2,27	0,35	0,24
	GC3 r17	0,46	0,37	0,17	0,08	1,86	1,42	0,29	0,19
	GC3 r18	0,72	0,60	0,24	0,18	1,13	1,39	0,20	0,18
	GC3 r19	0,47	0,97	0,27	0,10	0,92	1,52	0,26	0,26
GC5**	GC5 r7	0,72	0,75	0,53	0,08	1,96	1,87	0,34	0,26
	GC5 r9	0,65	0,66	0,23	0,18	1,77	1,75	0,35	0,25
	GC5 r15	0,67	0,82	0,12	0,07	0,86	1,05	0,35	0,26
	GC5 r17	0,48	0,48	0,13	0,08	0,75	0,86	0,30	0,22
	GC5 r21	0,80	0,72	0,07	0,08	0,47	0,51	0,27	0,23
GC6**	GC6 r1	0,48	0,42	0,09	0,08	0,77	1,00	0,20	0,27
	GC6 r2	0,84	0,66	0,11	0,08	0,23	0,17	0,23	0,20
	GC6 r3	0,84	0,75	0,08	0,08	1,27	1,30	0,23	0,20
	GC6 r4	0,55	0,62	0,08	0,07	0,19	0,15	0,30	0,27
	GC6 r5	0,63	0,52	0,09	0,08	0,19	0,15	0,21	0,20
	GC6 r6	0,50	0,59	0,09	0,08	0,28	0,24	0,40	0,44
GC10**	GC10 r1	0,48	0,63	0,08	0,07	0,16	0,14	0,47	0,33
	GC10 r2	0,87	0,76	0,08	0,07	0,16	0,14	0,25	0,23

Mh. Muestras positivas: muestras con valores de DO menores al PC +. Muestras negativas: muestras con valores de DO mayores al PC -. **PRRSv.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC. **PCV2.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC

	2ª serología		PCV2	
	Mh	PRRSv	IgG	IgM
DO C+	0,15	2,03	1,98	2,08
DO C-	0,98	0,11	0,16	0,17
PC +	**0,39**	**0,30**	**0,59**	**0,83**
PC -	**0,44**			

10.2 ELISA FRENTE A MH, PRRSV Y PCV2 EMPLEANDO SUERO SANGUÍNEO Y EXTRACTO PULMONAR

Tabla 22: DOs de las distintas muestras para ELISA frente a Mh, PRRVs y PCV2 (IgG/IgM) empleando suero sanguíneo (Suero) y extracto pulmonar (EP). Indicando, en rojo los valores de DO positivos y negro los negativos. En la serología de PCV2 quedarían sombreados en amarillo aquellos animales con Infección Reciente (uno o dos meses) (DO de IgG > IgM, siendo DO de IgM positiva) y en naranja aquellos con Infección Activa (DOs de IgM>IgG, siendo los valores de DO positivos). *sd, animales no analizados.*

	Mh		PRRSv		PCV2 IgG		PCV2 IgM	
	Suero	EP	Suero	EP	Ser.IgG	EP	Ser.IgM	EP
Ejemplar 1	0,52	0,84	0,08	0,14	1,15	1,31	0,24	0,07
Ejemplar 2	0,36	0,75	0,09	0,24	1,25	1,63	0,16	0,09
Ejemplar 3	0,45	0,79	0,11	0,13	1,27	1,66	0,60	0,12
Ejemplar 4	0,54	0,91	0,07	0,10	1,17	1,43	0,25	0,08
Ejemplar 5	0,57	0,86	0,07	0,09	1,36	1,66	0,24	0,07
Ejemplar 6	0,52	1,00	0,07	0,11	1,61	1,39	0,17	0,09
Ejemplar 7	sd	sd	0,11	0,10	1,52	1,74	0,16	0,12
Ejemplar 8	0,53	0,88	2,48	1,09	1,35	1,47	0,17	0,08
Ejemplar 9	0,51	0,92	0,07	0,13	1,02	1,11	0,13	0,05
Ejemplar 10	0,55	0,99	0,06	0,13	1,26	1,38	0,06	0,06
Ejemplar 11	0,50	0,91	0,10	0,13	1,57	1,64	0,20	0,11
Ejemplar 12	0,61	0,98	0,10	0,11	1,40	1,55	0,18	0,06
Ejemplar 13	0,65	0,88	0,08	0,10	0,63	0,86	0,18	0,07
Ejemplar 14	0,56	1,02	0,09	0,30	0,36	0,61	0,08	0,07
Ejemplar 15	0,55	0,96	0,16	0,14	1,14	1,41	0,44	0,14
Ejemplar 16	sd	sd	0,63	0,21	1,40	1,55	0,18	0,13
Ejemplar 17	0,50	0,90	0,10	0,12	1,31	1,41	0,36	0,13
Ejemplar 18	0,57	0,96	0,06	0,09	0,41	0,75	0,13	0,08

Mh. Muestras positivas: muestras con valores de DO menores al PC +. Muestras negativas: muestras con valores de DO mayores al PC -. **PRRSv.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC. **PCV2.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC.

			PCV2	
	Mh	**PRRSv**	**IgG**	**IgM**
DO C+	0,16	2,03	1,46	1,26
DO C-	1,02	0,13	0,05	0,07
PC +	**0,41**	**0,36**	**0,44**	**0,58**
PC -	**0,46**			

10.3 SEROLOGÍA EN LANZAROTE

Tabla 23: DOs de las distintas muestras para el ELISA frente a Mh, PRRVs y PCV2 (IgG/IgM) en cada explotación de Lanzarote. Indicando, en rojo los valores de DO positivos y negro los negativos. En la serología de PCV2 quedarían sombreados en amarillo aquellos animales con Infección Reciente (uno o dos meses) (DO de IgG > IgM, siendo DO de IgM positiva) y en naranja aquellos con Infección Activa (DOs de IgM>IgG, siendo los valores de DO positivos).

ID Exp	ID Anim	Mh	PRRS	PCV2	
				IgG	IgM
LZT1	LZT1 1	0,59	0,10	0,52	0,20
LZT2	LZT2 1	0,62	0,08	0,14	0,22
LZT3	LZT3 1	0,69	0,20	0,12	0,20
	LZT3 2	0,63	0,10	1,00	0,25
	LZT3 3	0,64	0,11	1,11	0,21
	LZT3 4	0,68	0,10	1,09	0,17
	LZT3 5	0,38	0,09	0,11	0,19
	LZT3 6	0,55	0,08	0,05	0,68
	LZT3 7	0,65	0,07	0,05	0,24
LZT4	LZT4 1	0,29	0,08	0,14	0,17
	LZT4 2	0,41	0,07	0,63	0,18
	LZT4 3	0,53	0,12	0,24	0,25
	LZT4 4	0,62	0,07	0,59	0,25
	LZT4 5	0,50	0,09	0,21	0,15
	LZT4 6	0,59	0,07	0,19	0,28
	LZT4 7	0,44	0,07	0,64	0,18
	LZT4 8	0,43	0,11	0,35	0,27
	LZT4 9	0,41	0,23	0,29	0,39
	LZT4 10	0,26	0,11	0,05	0,18
	LZT4 11	0,19	0,07	0,06	0,22
	LZT4 12	0,19	0,14	0,05	0,17
	LZT4 13	0,23	0,06	0,05	0,25
	LZT4 14	0,48	0,11	0,06	0,21
	LZT4 15	0,44	0,07	0,05	0,17
	LZT4 16	0,42	0,08	0,05	0,27
	LZT4 17	0,37	0,08	0,05	0,11
	LZT4 18	0,22	0,08	0,05	0,15
LZT5	LZT5 1	0,60	0,38	1,49	0,18
	LZT5 2	0,46	0,12	0,05	0,13
LZT6	LZT6 1	0,54	0,07	1,20	0,36
	LZT6 2	0,63	0,09	1,45	0,21
	LZT6 3	0,68	0,12	1,45	0,26
LZT7	LZT7 1	0,30	0,75	1,40	0,16
	LZT7 2	0,42	2,90	1,46	0,16
	LZT7 3	0,42	2,91	1,31	0,14
LZT8	LZT8 1	0,55	0,10	0,06	0,27
	LZT8 2	0,45	0,09	0,05	0,44
	LZT8 3	0,31	0,28	0,05	0,13
	LZT8 4	0,45	0,07	0,06	0,19

Mh. Muestras positivas: muestras con valores de DO menores al PC +. Muestras negativas: muestras con valores de DO mayores al PC -. **PRRSv.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC. **PCV2.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC.

			PCV2	
	Mh	PRRSv	IgG	IgM
DO C+	0,17	1,59	1,43	1,19
DO C-	0,81	0,12	0,08	0,10
PC +	**0,32**	**0,26**	**0,43**	**0,48**
PC -	**0,36**			

10.4 SEROLOGÍA EN TENERIFE

Tabla 24: DOs de las distintas muestras para el ELISA frente a Mh, PRRVs y PCV2 (IgG/IgM) en cada explotación de Tenerife. Indicando, en rojo los valores de DO positivos y negro los negativos. En la serología de PCV2 quedarían sombreados en amarillo aquellos animales con Infección Reciente (uno o dos meses) (DO de IgG > IgM, siendo DO de IgM positiva) y en naranja aquellos con Infección Activa (DOs de IgM>IgG, siendo los valores de DO positivos).

ID Exp	ID Anim	Mh	PRRSv	PCV2	
				IgG	IgM
TF1	TF1 1	0,40	0,25	1,10	0,12
TF2	TF2 1	0,62	0,10	1,75	0,23
	TF2 2	0,62	0,10	1,18	0,13
	TF2 3	0,65	0,08	1,64	0,25
TF3	TF3 1	0,62	0,12	1,72	0,33
TF4	TF4 1	0,62	0,14	0,05	0,21
	TF4 2	0,76	0,30	0,06	0,19
	TF4 3	0,81	0,22	0,72	0,22
	TF4 4	0,68	0,11	0,96	0,34
	TF4 5	0,54	0,12	1,61	0,28
TF5	TF5 1	0,49	0,07	0,44	0,18
	TF5 2	0,39	0,08	1,41	0,22
	TF5 3	0,53	0,12	1,63	0,84
	TF5 4	0,54	0,21	1,64	0,41
	TF5 5	0,58	0,14	1,25	0,42
	TF5 6	0,53	0,09	1,37	0,28
	TF5 7	0,53	0,38	0,97	0,11
	TF5 8	0,50	0,09	0,63	0,21
	TF5 9	0,52	0,09	1,15	0,13
	TF5 10	0,49	0,10	0,53	0,16
TF6	TF6 1	0,29	2,34	1,60	0,32
	TF6 2	0,57	0,09	1,48	0,59
	TF6 3	0,78	0,07	0,72	0,11
	TF6 4	0,19	0,26	1,42	0,17
	TF6 5	0,08	2,29	1,36	0,26
TF7	TF7 1	0,67	0,54	1,35	0,17
	TF7 2	0,58	0,07	1,15	0,23
	TF7 3	0,90	0,08	0,93	0,11
	TF7 4	0,68	0,08	1,61	0,13
TF8	TF8 1	0,55	0,25	1,70	0,17
	TF8 2	0,43	0,19	1,41	0,57
	TF8 3	0,57	0,19	0,05	0,18
TF9	TF9 1	0,49	0,27	0,77	0,23
	TF9 2	0,54	0,08	1,20	0,15
	TF9 3	0,64	0,17	0,36	0,10
TF10	TF10 1	0,49	0,28	1,59	0,11
	TF10 2	0,79	0,20	0,08	0,15
TF11	TF11 1	0,64	0,28	1,39	0,14
	TF11 2	0,63	0,27	1,18	0,35
	TF11 3	0,61	0,26	1,59	0,14
	TF11 4	0,62	0,19	1,58	0,12

Mh. Muestras positivas: muestras con valores de DO menores al PC +. Muestras negativas: muestras con valores de DO mayores al PC -. **PRRSv.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC. **PCV2.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC.

				PCV2	
	Mh TF1-TF4/TF6-TF10	**Mh TF5**	**PRRSv**	**IgG**	**IgM**
DO C+	0,21	0,18	1,85	1,59	1,44
DO C-	1,06	0,76	0,18	0,04	0,07
PC +	**0,42**	**0,30**	**0,32**	**0,48**	**0,58**
PC -	**0,48**	**0,34**			

10.5 SEROLOGÍA EN LA PALMA

Tabla 25: DOs de las distintas muestras para ELISA frente a Mh, PRRVs y PCV2 (IgG/IgM) en cada explotación de La Palma. Indicando, en rojo los valores de DO positivos y negro los negativos. En la serología de PCV2 quedarían sombreados en amarillo aquellos animales con Infección Reciente (uno o dos meses) (DO de IgG > IgM, siendo DO de IgM positiva) y en naranja aquellos con Infección Activa (DOs de IgM>IgG, siendo los valores de DO positivos).

ID Explot	ID Animal	Mh	PRRSv	PCV2	
				IgG	IgM
LP1	LP1 1	0,61	0,11	1,38	0,19
	LP1 2	0,42	0,10	0,73	0,23
	LP1 3	0,56	0,07	1,39	0,15
	LP1 4	0,48	0,08	1,32	0,19
	LP1 5	0,55	0,07	1,37	0,47
	LP1 6	0,54	0,08	1,45	0,19
	LP1 7	0,55	0,08	1,16	0,19
	LP1 8	0,63	0,16	0,90	0,15
LP2	LP2 1	0,53	0,18	1,31	0,15
	LP2 2	0,58	0,10	1,54	0,11
LP3	LP3 1	0,10	0,10	1,44	0,40
LP4	LP4 1	0,58	0,08	0,63	1,37
	LP4 2	0,58	0,08	1,76	1,17
LP5	LP5 1	0,32	0,09	0,06	0,45
LP6	LP6 1	0,18	0,12	0,06	0,13
	LP6 2	0,41	2,28	1,23	0,13
	LP6 3	0,53	0,09	1,27	0,11
	LP6 4	0,57	0,09	1,24	0,12

Mh. Muestras positivas: muestras con valores de DO menores al PC +. Muestras negativas: muestras con valores de DO mayores al PC -. **PRRSv.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC. **PCV2.** Muestras positivas: muestras con valores de DO mayores al PC

			PCV2	
	Mh	**PRRSv**	**IgG**	**IgM**
DO C+	0,18	1,55	1,49	1,44
DO C-	0,79	0,16	0,058	0,08
PC +	**0,32**	**0,27**	**0,45**	**0,58**
PC -	**0,35**			

AGRADECIMIENTOS

"El agradecimiento es la memoria del corazón", Lao-Tse.

11 AGRADECIMIENTOS

Si algo he aprendido en la vida, es que las cosas llegan cuando toca y no cuando uno las planea… pero también he aprendido que… AL FINAL, TODO LLEGA.

Por supuesto, este momento también ha llegado….

Dar las gracias a todos, por tanto cariño, dedicación y motivación, por tanto apoyo y paciencia, y por supuesto, por todo lo que he aprendido de cada uno. Cada página de este trabajo lleva impregnado un poquito de ustedes, y es mucho más de lo que nunca había imaginado, porque he tenido la enorme fortuna de haber estado arropada de principio a fin por grandísimas personas.

No puedo empezar de otra manera… GRACIAS a él, mi mayor tesoro, *mi pequeño gran hombre*. Alguien que, a pesar de su corta edad, de alguna manera supo entender mi ausencia durante un tiempo… que parecía bastarle con una caricia, un beso o un abrazo, mientras mamá seguía pegada al ordenador. De quien, cada día aprendo algo nuevo. Alguien que me ha enseñado el verdadero valor de las cosas… a ser paciente… esa gran virtud, que creía no tener… y que me ha servido en innumerables ocasiones durante este largo camino. Él ha sido mi motor para seguir adelante y mi refugio cuando todo estaba patas arriba. Quizás puedan pensar que sin él habría terminado antes… yo estoy convencida de que sólo lo he conseguido gracias a él… **A ti, IVÁN, eternamente agradecida.**

Mi otro gran apoyo… **mis padres**. Gracias por todos los valores que me han intentado inculcar. De ellos he aprendido que en la vida, todo se consigue con trabajo, constancia y esfuerzo, que es más reconfortante dar que recibir, y que *en el camino para conseguir ser un buen profesional, siempre debemos intentar ser mejor persona*.

Gracias **mamá** por apoyarme en todas mis decisiones, por escucharme cada día y por tus palabras de ánimo cuando estaba sin aliento. **Papá**… gracias por ser como eres, por estar siempre pendiente, por enseñarme que si uno de verdad lo desea, es capaz de conseguir lo que se proponga. Gracias a los dos por vuestra generosidad y humildad… por estar siempre junto a mí.

A Abel, por acompañarme en este largo camino, por tu amor incondicional, incluso sin entender muy bien el porqué de mis decisiones. Gracias a ti he conseguido superarme cada día más. Gracias por tomar las riendas cuando más lo he necesitado, y liberarme en cierta medida de algunas de mis preocupaciones. A Beni y Alexis, porque han sido un pilar muy importante para mí en todo este proceso, muchas gracias por vuestro apoyo y vuestros ánimos, por estar ahí, siempre. A Mayling, a quien tuve la enorme suerte de tener a mi lado, muchas gracias. A todos, aunque no les nombre, uno por uno… mi familia, GRACIAS.

A Marisa… sin ella esto no habría sido posible. Muchísimas gracias, por tu incansable labor, tu compromiso, gran profesionalidad, dedicación y motivación, por tu enorme generosidad, incluso en los momentos más duros. Gracias por confiar en mi capacidad, mucho más que yo misma, animándome siempre a dar el siguiente paso. Pero sobre todo, muchas gracias por acompañarme en los momentos más importantes de mi vida.

A Pedro… mil gracias. Por tu entusiasmo, tu gran profesionalidad y dedicación. Por sumar cada día… por tu infinita energía y por, aún en los momentos de tensión, saber sacar el lado positivo de las cosas. Gracias por hacer fácil lo difícil.

A Toño, gracias por ser un gran profesional y sobre todo mejor persona. Gracias por tu apoyo, por confiar en mis posibilidades y por estar siempre pendiente.

También quiero agradecer el apoyo recibido por parte de la Asociación de Criadores de Cochino Negro Canario, y en particular a su Presidente Rafael Riera, por la ardua tarea de velar por la recuperación de esta raza. Gracias a todos aquellos profesionales que en algún momento colaboraron de forma activa con la Asociación y con quienes tuve la oportunidad de trabajar.

Y por supuesto, A CADA UNO DE VOSOTROS… profesores y compañeros, grandes personas que han estado a mi lado. Por suerte, han sido muchos y a todos les debo un gran respeto. GRACIAS… porque, de una manera u otra, todos han contribuido en mi crecimiento como profesional, y por extensión a nivel personal. Algunos han estado presentes en todo el proceso, otros han formado parte importante en algún momento… a todos GRACIAS.

Pero sobre todo, MUCHAS GRACIAS a esas personas que supieron cruzar la línea y hacerse un huequito en mi corazón, nunca olvidaré cada una de vuestras palabras, me gustaran o no, e incluso vuestros silencios, cuando también los necesité. Gracias por saber llevar mi impaciencia… por contenerme en los momentos de desesperación, por vuestra sinceridad… por vuestra INFINITA CALIDAD HUMANA. Gracias por estar, aunque "sólo" fuera con un abrazo o un "simple" *buenos días*….

"Sobran las palabras, cuando los hechos hablan".

A TODOS Y SIN EXCEPCIÓN…GRACIAS.

BIBLIOGRAFÍA

12 BIBLIOGRAFÍA

Aarbiou, J., van Schadewijk, A., Stolk, J., Sont, J. K., de Boer, W. I., Rabe, K. F., van Krieken, J., Mauad, T., & Hiemstra, P. S. (2004). Human neutrophil defensins and secretory leukocyte proteinase inhibitor in squamous metaplastic epithelium of bronchial airways.*Inflammation Research*, *53*(6), 230-238.

Ackermann, M.R., Debey, M.C., & Debey, B.M.(1991). Bronchiolar Metaplasia and Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I) Affinity in *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected lungs of six pigs. *Veterinary Pathology* 28, 533-535.

Adlerova L, B.A., & Faldyna M. (2008). Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina,* 53, 457-468.

Ahrens P.(1996). Identification of *Mycoplasma hyosynoviae* in clinical samples by PCR. *11th Congress of the International Organization for Mycoplasmalogy*, Orlando, Florida, 38.

Ahrens, P., & Friis, N. (1991). Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* with a DNA probe. *Letters in Applied Microbiology* 12 (6), 249-253.

Albina, E., Cariolet, R., Eveno, E., Hutet, E., & Madec, F. (1996). Premiers resultats du CNEVA sur le deperissement fatal du porcelet en fin de postsevrage. *Suppl Sem Vet*, *834*, 1-2.

Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., & Torrison, J. (1994). Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Veterinary Record,* 134 (22), 567-573.

Albina, E., Mesplede, A., Chenut, G., Le Potier, M. F., Bourbao, G., Le Gal, S., & Leforban, Y. (2000). A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Veterinary microbiology*, *77*(1), 43-57.

Albina, E., Truong, C., Hutet, E., Blanchard, P., Cariolet, R., L'Hospitalier, R., Mahe, D., Allee, C., Morvan, H., Amenna, N., Le Dimna, M., Madec, F., & Jestin, A. (2001). An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *Journal of Comparative Pathology* 125 (4), 292-303.

Allan, G. M., McNeilly, E., Kennedy, S., Meehan, B., Moffett, D., Malone, F., Ellis, J., & Krakowka, S. (2000). PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990.*Veterinary Record*, *146*(24), 711-712.

Allan, G.M., & Ellis, J.A. (2000). Porcine circoviruses: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(1), 3-14.

Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., & Adair, B.M. (1999a). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology,* 121(1), 1-11.

Allan, G.M., Krakowka, S., & Ellis, J. (2002). PCV2: ticking time bomb? *Pig Progress*, 18(5), 14-15.

Allan, G.M., Mc Neilly, F., Meehan, B.M., Kennedy, S., Mackie, D.P., Ellis, J.A., Clark, E.G., Espuna, E., Saubi, N., Riera, P., Botner, A., & Charreyre, C.E. (1999b). Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Veterinary Microbiology*, 66(2), 115-123.

Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A., Adair, B., Ellis, W.A., & McNulty, M.S. (1995). Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary microbiology*, 44(1), 49-64.

Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., & Adair, B.M. (1998). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(1), 3-10.

Allan, G.M., Phenix, K.V., Todd, D., & McNulty, M.S. (1994). Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 41(1-10), 17-26.

Allende, R., Laegreid, W. W., Kutish, G. F., Galeota, J. A., Wills, R. W., & Osorio, F. A. (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *Journal of virology*, *74*(22), 10834-10837.

Álvarez, B., López-Fuertes, L., Domenech, N., & Dominguez, J. (1997). Células del sistema inmunitario porcino. *Porci*, (40), 35-45.

Amanfu, W., Weng, C. N., Ross, R. F., & Barnes, H. J. (1984). Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: sequential study by direct immunofluorescence. *American journal of veterinary research*, *45*(7), 1349-1352.

Amass, S.F., Clark, L.K., Vanalstine, W.G., Bowersock, T.L., Murphy, D.A., Knox, K.E., & Albregts, S.R. (1994). Interaction of *Mycoplasma-hyopneumoniae* and *Pasteurella-multocida* infections in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(1), 102-107.

Ameri, M., Zhou, E.M., & Hsu, W.H. (2006). Western blot immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in swine serum. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(2), 198-201.

Andrada, M. (2001). Estudio etiopatogénico de la Neumonía Enzoótica Porcina (NEP). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria.

Andrada, M. (2008). Perfil serológico del Cochino Negro Canario aplicado al intercambio de animales entre islas para la mejora genética. *Beca de Investigación Simón Benítez Padilla-2008: Biología de Canarias.*

Andrada, M., Sarradell, J. Ramírez, A. S. Segalés, J. Rodríguez, F., & Fernández, A. (2000). First report of porcine circovirus associated with porcine respiratory reproductive syndrome in the Canary Islands. In *The 18th European Society of Veterinary Pathology.* 251. Amsterdam-Holanda.

Andreasen, M., Nielsen, J.P., Baekbo, P., Willeberg, P., & Botner, A. (2000). A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 45(3), 221-235.

Anonymous. (1992). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS or blue-eared pig disease). *Veterinary Record*, 130(5), 87-89.

Aragon, V., Segales, J., & Oliveira, S. (2012). Glässers Disease. In Zimmerman, J. J. , Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., & Stevenson, G. W., (eds.) *Diseases of swine*, *10*, 760-769. John Wiley & Sons, Inc.

Arruda, A. G., Poljak, Z., Friendship, R., Carpenter, J., & Hand, K. (2015). Descriptive analysis and spatial epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) for swine sites participating in area regional control and elimination programs from 3 regions of Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *79*(4), 268-278.

Asai, T., Okada, M., Yokomizo, Y., Sato, S., & Mori, Y. (1996). Suppressive effect of bronchoalveolar lavage fluid from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* on chemiluminescence of porcine peripheral neutrophils. *Veterinary immunology and immunopathology*, 51(3), 325-331.

Assunção, P., Fe, C.D.l., Ramírez, A.S., Llamazares, O.G., & Poveda, J.B. (2005). Protein and Antigenic Variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* Strains by SDS-PAGE and Immunoblot. *Veterinary Research Communications*, *29,* 563-574

Baker, S.R., O'neil, K.M., Gramer, M.R., & Dee, S.A. (2011). Estimates of the seroprevalence of production-limiting diseases in wild pigs. *Veterinary Record*, *168*(21).

Baker, T. F., McEwen, S. A., Prescott, J. F., & Meek, A. H. (1989). The prevalence of leptospirosis and its association with multifocal interstitial nephritis in swine at slaughter. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *53*(3), 290.

Balasch, M., Segales, J., Rosell, C., Domingo, M., Mankertz, A., Urniza, A., & Plana-Duran, J. (1999). Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of comparative pathology*, 121(2), 139-148.

Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, *392*(6673), 245-252.

Baroch, J.A., Gagnon, C.A., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (2015). Exposure of feral swine (Sus scrofa) in the United States to selected pathogens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *79*(1), 74-78.

Baskerville, A. (1970). Ultrastructural studies of the normal pulmonary tissue of the pig. *Research in veterinary science*, 11, 150-155.

Batista, L., Dee, S.A., Rossow, K.D., Deen, J., & Pijoan, C. (2002). Assessing the duration of persistence and shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of breeding-age gilts. *Canadian journal of veterinary research*, 66(3), 196-200.

Baumeister, A.K., Runge, M., Ganter, M., Feenstra, A.A., Delbeck, F., & Kirchhoff, H. (1998). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 1984-1988.

Bautista, E. M., Goyal, S. M., & Collins, J. E. (1993). Serologic survey for Lelystad and VR-2332 strains of porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) virus in US swine herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5(4), 612-614.

Beck, R., Gašpar, A., Mihaljević, Ž., Marinculić, A., Stojčević, D., & Brstilo, M. (2005). Evaluation of ELISA for detection of Trichinella antibodies in muscle juice samples of naturally infected pigs.*Veterinary parasitology*, *132*(1), 91-95.

Benfield, D.A., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Rowland, R.R.R., & Nelson, J.K. (1997). Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Proceedings of the 28th Annual Meeting American Association Swine Practitioners*, 455-458.

Benfield, D.A., Nelson, E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D., & Chladek, D. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(2), 127-133.

Bereiter, M., Young, T. F., Joo, H. S., & Ross, R. F. (1990). Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Veterinary microbiology*, *25*(2), 177-192.

Beskow, P., Norqvist, M., & Wallgren, P. (1998). Relationships between selected climatic factors in fattening units and their influence on the development of respiratory diseases in swine. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 39(1), 49-60.

Bienenstock, J., & Clancy, R. (1994). Bronchial mucosal lymphoid tissue. Ogra PL, S.W. (Ed.) *Handbook of Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, 529-538.

Bienenstock, J., McDermott, M.R., & Clancy, R.L. (1999). Respiratory tract defenses: Role of mucosal lymphoid tissues, Ogra P.L., Mestecky, J., Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR (Ed.) *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, pp. 283-292.

Bilic, B. N., & Bilkei, G. (2006). Effect of outdoor pig production on the seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* and lung lesions. *Veterinary record*,*158*(9), 303-305.

Bilkei, G. (1996). The management of veterinary extension activities and the practical experiences of pig breeding advisory bureaus in western Europe.*Proc Pig Days University of Budapest*, 1-3.

Blanchard, B., Saillard, C., Kobisch, M., & Bove, J.M. (1996) Analysis of putative ABC transporter genes in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology*, 142(7), 1855-1862.

Blanchard, P., Mahé, D., Cariolet, R., Truong, C., Le Dimna, M., Arnauld, C., Rose, N., Eveno, E., Albina, E., Madec, F., & Jestin, A. (2003). An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type *2* antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary microbiology*, 94(3), 183-194.

Boadella, M., Ruiz-Fons, J.F., Vicente, J., Martin, M., Segalés, J., & Gortazar, C. (2012). Seroprevalence evolution of selected pathogens in Iberian wild boar. *Transboundary and emerging diseases*, 59(5), 395-404.

Bochev, I. (2007). Porcine respiratory disease complex (PRDC): A review. I. Etiology, epidemiology, clinical forms and pathoanatomical features.*Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, *10*(3), 131-146.

Bochev, I. (2008) Porcine respiratory disease complex (PRDC): A review. II, diagnostics, treatment and prevention. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 11(4), 219−234.

Boettcher, T.B., Thacker, B.J., Halbur, P., Waters, R., Nutsch, R., & Thacher, E.L. (2002). Vaccine efficacy and immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae* challenge in pigs vaccinated against porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *M hyopneumoniae. Journal of Swine Health and Production*, 10(6), 259-264.

Bolin S.R., S.W., Nayar, G.P.S. & Hamel A.L. (2001). Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrumdeprived piglets with *type 2 porcine circovirus. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(3), 185-194.

Bollo, J. M., Menjon, R., & Cairo, E. (2008). Review of the" 0 to 5 scoring method" for enzootic pneumonia slaughterhouse lesions. In *Proceeding of the 20th International Pig Veterinary Society Congress,* 5. Durban, South Africa.

Bolt, D. M., Häni, H., Müller, E., & Waldvogel, A. S. (1997). Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. *Journal of comparative pathology*, *117*(2), 107-118.

Bonilauri, P., Merialdi, G., Dottori, M., & Barbieri, I. (2006). Presence of PRRSV in wild boar in Italy.*Veterinary record*, *158*(3), 107-108.

Boqvist, S., Montgomery, J. M., Hurst, M., Thu, H. T. V., Engvall, E. O., Gunnarsson, A., & Magnusson, U. (2003). Leptospira in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings.*Veterinary microbiology*, *93*(4), 361-368.

Borel, N., Bürgi, E., Kiupel, M., Stevenson, G. W., Mittal, S. K., Pospischil, A., & Sydler, T. (2001). [Three cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) due to porcine circovirus type 2 (PCV 2) in Switzerland.]. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, *143*(5), 249-255.

Borgsteede, F. H., & Jongbloed, A. W. (2001). Organic pig farming: what about parasitic infections?. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*,*126*(2), 39-42.

Botner, A., Nielsen, J. & Bille-Hansen, V. (1994). Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus, *Veterinary microbiology*, 40(3), 351-360.

Botner, A., Strandbygaard, B., Sørensen, K. J., Have, P., Madsen, K. G., Madsen, E. S., & Alexandersen, S. (1997). Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Veterinary Record*, *141*(19), 497-499.

Bove, J.M. (1993). Molecular-Features of Mollicutes. *Clinical infectious diseases*, 17(Supplement 1), S10-S31.

Bradley, P.A., Bourne, F.J. & Brown, P.J. (1976a). The respiratory tract immune system in the pig: I. Distribution of immunoglobulin-containing cells in the respiratory tract mucosa. *Veterinary Pathology Online*, 13(2), 81-89.

Bradley, P.A., Bourne, F.J. & Brown, P.J. (1976b). The Respiratory Tract Immune System in the Pig: II. Associated Lymphoid Tissues. *Veterinary Pathology Online*, 13(2), 90-97.

Brandtzaeg, P., Farstad, I.N. & Haraldsen, G. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunology today*, 20(6), 267-277.

Braude, R. & Plonka, S. (1975). Effects of enzootic pneumonia on the performance of growing pigs. *Veterinary Record*, 96(16), 359-360.

Breeze RG, W.E. & Pirie, H.M. (1976). Cell structure and function in the mammalian lung: the trachea, bronchi and bronchiole. *Veterinary Bulletin*, 46,319-337.

Brockmeier, S. L., Palmer, M. V., Bolin, S. R., & Rimler, R. B. (2001). Effects of intranasal inoculation with Bordetella bronchiseptica, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, or a combination of both organisms on subsequent infection with Pasteurella multocida in pigs. *American journal of veterinary research*, *62*(4), 521-525.

Brockmeier, S. L., Register, K. B., Nicholson, T. L. & Loving, C. L. (2012). Bordetellosis. In Zimmerman, J. J. , Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., & Stevenson, G. W. (eds.) *Diseases of swine*, *10*, 760-769. John Wiley & Sons, Inc.

Brockmeier, S.L., Halbur, P.G., Thacker, E.L. (2002). Porcine Respiratory Disease Complex. In Brogden, K.A., Guthmiller, J.M., (eds.) *Polymicrobial Diseases*. *13.* Washington (DC): ASM Press. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2481/

Brown, C.C., Baker, D.C., & Barker, I.K. (2007). Alimentary system. In *Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals*, *2*, 1-296.

Bruggmann, S., Engberg, B. & Ehrensperger. (1977). Demonstration of *M. suipneumoniae* in pig lungs by enzyme-linked immunoperoxidase technique. *Veterinary Record*, 101(7), 137-137.

Brun, A., Charreyre, C., Vaganay, A. & Reynaud, G. (1994). Porcine reproductive respiratory syndrome; role of other infectious agents in the respiratory disease of swine. *13th International Pig Veterinary Congress*, Bangkok, Thailand.

Brunborg, I. M., Fossum, C., Lium, B., Blomqvist, G., Merlot, E., Jørgensen, A., Eliasson-Selling, L., Rimstad, E., Jonassen, C.M. & Wallgren, P. (2010). Dynamics of serum antibodies to and load of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs in three finishing herds, affected or not by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Acta Vet Scandinavica*, *52*, 22.

Brunborg, I. M., Moldal, T., & Jonassen, C. M. (2004). Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *Journal of virological methods*, *122*(2), 171-178.

Brunborg, I.M., Jonassen, C.M., Moldal, T., Bratberg, B., Lium, B., Koenen, F. & Schönheit, J. (2007). Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 19(4), 368-375.

Bukovsky, C., Schmoll, F., Revilla-Fernández, S. & Weissenböck, H. (2007). Studies on the aetiology of non-suppurative encephalitis in pigs*. The Veterinary Record,* 161(16), 552-558.

Burch, D. G. (2007). Cost of Disease-Enzootic Pneumonia. *Mortality*, *2*, 0.

Busse, F.W., Alt, M., Janthur, I., Neumann, W. & Schoss, A.P. (1992). Epidemiologic studies on porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) in lower Saxony of Germany. *Proceedings of the 12 th Congress International Pig Veterinary Society*. The Netherlands, 1, 115.

Busse, W., Elias, J., Sheppard, D., & Banks-Schlegel, S. (1999). Airway remodeling and repair. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *160*(3), 1035-1042.

Buttenschoen, J. (1989). Differentiation between five types of pneumonia distribution pattern in pigs.*Journal of Veterinary Medicine series A*, *36*(1-10), 494-504.

Cabaret, J. (2003). Animal health problems in organic farming: subjective and objective assessments and farmers' actions. *Livestock Production Science*, *80*(1), 99-108.

Cai H.Y., van Dreumel, T., McEwen, B., Hornby, G., Bell-Rogers, P., McRaild, P., Josephson, G. & Maxie,G. (2007). Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *19*(1), 91-95.

Calsamiglia, M. & Pijoan, C. (2000). Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Veterinary Record*, 146(18), 530-532.

Calsamiglia, M., Collins, J. E., & Pijoan, C. (2000). Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR.*Veterinary microbiology*, *76*(3), 299-303.

Calsamiglia, M., Fraile, L., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., Martin, M., Mateu, E., Domingo, M., & Segalés, J. (2007). Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Research in veterinary science*, *82*(3), 299-304.

Calsamiglia, M., Olvera, A., Segalés, J. & Domingo, M. (2004). Quantification of PCV2 in different routes of excretion: possible transmission routes and correlation with presence of PMWS characteristic lesions. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*, p.11.

Calsamiglia, M., Pijoan, C. & Trigo, A. (1998). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swabs using a nested PCR technique. *Proceedings of the 15th IPVS Congress*, Birmingam, England.

Calsamiglia, M., Pijoan, C. & Trigo, A. (1999). Application of a Nested Polymerase Chain Reaction Assay to Detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from Nasal Swabs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(3), 246-251.

Calsamiglia, M., Segalés, J., Quintana, J., Rosell, C. & Domingo, M. (2002). Detection of Porcine Circovirus Types 1 and 2 in Serum and Tissue Samples of Pigs with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), 1848-1850.

Carasova, P., Celer, V., Takacova, K., Trundova, M., Molinkova, D., Lobova, D., & Smola, J. (2007). The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. *Research in veterinary science*, *83*(2), 274-278.

Carman, S., McEwen, B., DeLay, J., van Dreumel, T., Lusis, P., Cai, H., & Fairles, J. (2006). Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005): ONTARIO. *The Canadian Veterinary Journal*, *47*(8), 761.

Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Archives of Virology 142(3), 629-633.

Celer, V., & Carasova, P. (2002). First Evidence of Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) Infection of Pigs in the Czech Republic by Semi-Nested PCR. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *49*(3), 155-159.

Chae, C. (2004). Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *The Veterinary Journal*, *168*(1), 41-49.

Chae, C. (2005). A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *The Veterinary Journal*, *169*(3), 326-336.

Charley, B. & Corthier, G. (1977). Local immunity in the pig respiratory tract. II. -- Relationship of serum and local antibodies. *Annales de microbiologie, 128*(1), 109-119.

Cheikh Saad Bouh, K., Shareck, F. & Dea, S. (2003). Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. *Clinical and Vaccine Immunology 10*(3), 459-468.

Cheng, C.C., Lee, Y.F., Lin, N.N., Wu, C.L., Tung, K.C. & Chiu, Y.T. (2011). Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia in Swine associated with porcine circovirus type 2 infection. *BioMed Research International*.

Cheon, D.S., Chae, C. & Lee, Y.S. (1997). Seroprevalence of Antibody to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Selected Herds in Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 9*(4), 434-436.

Chianini, F., Majo, N., Segalés, J., Dominguez, J. & Domingo, M. (2001). Immunohistological study of the immune system cells in paraffin-embedded tissues of conventional pigs. *Veterinary immunology and immunopathology, 82*(3), 245-255.

Chianini, F., Majo, N., Segalés, J., Domınguez, J., & Domingo, M. (2003). Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *94*(1), 63-75.

Chiers, K., Donné, E., Van Overbeke, I., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Veterinary Microbiology*, *85*(4), 343-352.

Chilvers, M.A. & O'Callaghan, C. (2000). Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatric Respiratory Reviews*, 1(1), 27-34.

Chiou, M., Lin, C., Chuang, M., Chiang, H. & Tsai, C. (2004). Etiological and epidemiological survey of PRDC associated pathogens in Taiwan. *Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress*, Hamburg, p 191.

Chiurciu, V., & Raduta, M. M. (2014). Seroprevalence of some immunosuppressive agents (PRRSV, M. hyopneumoniae and PCV2) in wild boars (Sus scrofa) in Romania (2013). *Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, *47*(1), 20-25.

Cho, J.G. & Dee, S.A. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, *66*(3), 655-662.

Choi, C. & Chae, C. (1999). In-situ hybridization for the detection of *porcine circovirus* in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Comparative Pathology 121*(3), 265-270.

Choi, C. & Chae, C. (2001). Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephropathy syndrome by double-labeling technique. *Veterinary Pathology Online*, *38*(4), 436-441.

Choi, C., Chae, C. & Clark, E.G. (2000). Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *12*(2), 151-153.

Choi, E.J., Lee, C.H., Hyun, B.H., Kim, J.J., Lim, S.I., Song, J.Y. & Shin, Y.K. (2012). A survey of porcine reproductive and respiratory syndrome among wild boar populations in Korea. *Journal of veterinary science*, 13(4), 377-383.

Choi, Y.K., Goyal, S.M. & Joo, H.S. (2003). Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *The Canadian veterinary journal, 44*(9), 735.

Christensen, G., Sørensen, V., & Mousing, J. (1999). Diseases of respiratory system. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W., Taylor, D.J. (eds.), *Diseases of Swine*. Iowa University Press, Ames, Iowa, pp. 913–940.

Christensen, N.H. (1998). A unified scoring scheme for pleurisy in slaughter pigs. *Proceedings of the 15th IPVS Congress*, Birmingam, England.

Christianson, W.T., Choi, C.S., Collins, J.E., Molitor, T.W., Morrison, R.B. & Joo, H.S. (1993). Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus-infection in midgestation sows and fetuses. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 57(4), 262.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E., Nelson, J., Rossow, K., Rowland, R., Yeager, M., Chase, C. & Benfield, D. (1996). Identification of PRRSV in semen and tissue of vasectomized and non-vasectomized boars. *Conference of Research Workers in Animal Disease* p. 182.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Nelson, J.K. & Benfield, D.A. (1997). Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *American journal of veterinary research*, 58(1), 40-45.

Ciprian, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tortora, J., Colmenares, G., López-Revilla, R. & de la Garza, M. (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 52(4), 434-438.

Clark, E. (1997). Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners*, pp. 499–501.

Clark, E. G. (1996). Pathology of the post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs. In *Proceedings Western Canadian Association Swine Practitioners* (pp. 22-25).

Clark, L. K., Armstrong, C. H., Freeman, M. J., Scheidt, A. B., Sands-Freeman, L., & Knox, K. (1991). Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. *Veterinary medicine (USA)*.

Clark, L.K.A., Armstrong, C.H., Scheidt, A.B. & Van Alstine, W.G. (1993). The effect of *Mycoplasma hyopenumoniae* infection on growth in pigs with or without environmental constraints. *Swine Health and Production*, 1(6), 10-14.

Closa-Sebastià, F., Casas-Díaz, E., Cuenca, R., Lavín, S., Mentaberre, G. & Marco, I. (2011). Antibodies to selected pathogens in wild boar (Sus scrofa) from Catalonia (NE Spain). *European Journal of Wildlife Research*, 57(4), 977-981.

Collins, J., Dee, S., HaIbur, P., Keffaber, K., Lautner, B., McCaw, M., Rodibaugh., Sanford, E., Yeske, P. (1996). Laboratory diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *Swine Health and Production,* 4(1), 33-35.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., Gorcyca, D. & Chladek, D. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (Isolate ATCC VR-2332) in North-America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(2), 117-126.

Collins, J.E., Benfield, D.A., Goyal, S.M., Shaw, D.P. (1990). Experimental transmission of swine reproductive failure syndrome (mystery swine disease) in gnotobiotic pigs. *71st Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease*, Chicago, IL p. 71:71.

Cone, R. (1999). Mucus. Ogra, P.L., M.J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R. (Ed.) *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego.

Cooper, V. L., Hesse, R. A., & Doster, A. R. (1997). Renal lesions associated with experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *9*(2), 198-201.

Cooper, V.L., Doster, A.R., Hesse, R.A. & Harris, N.B. (1995). Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 7(3), 313-320.

Copeman, D. B., & Gaafar, S. M. (1972). Sequential development of hepatic lesions of ascaridosis in colostrum-deprived pigs. *Australian veterinary journal*, *48*(5), 263-268.

Corn, J.L., Cumbee, J.C., Barfoot, R. & Erickson, G.A. (2009). Pathogen exposure in feral swine populations geographically associated with high densities of transitional swine premises and commercial swine production. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(3),713-721.

Corpa, J. M., Perez, V., & Marın, J. G. (2000). Differences in the immune responses in lambs and kids vaccinated against paratuberculosis, according to the age of vaccination. *Veterinary Microbiology*, 46 (3), 475-485.

Correa, A.M., Zlotowski, P., de Barcellos, D.E., da Cruz, C.E. & Driemeier, D. (2007). Brain lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(1), 109-112.

Cowan, T.R. & van Buren, J.W. (1986). Neumonía micoplásmica. *Medicina Veterinaria,* 3(12), 645-648.

Csagola, A., Kecskemeti, S., Kardos, G., Kiss, I. & Tuboly, T. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Archives of virology*, 151(3), 495-507.

Cuesta, J.M., Risco, D., Gonçalves, P., García, W.L., Gil, M., Fernández-Llario P, Hermoso de Mendoza, J., Gómez, L.J. (2013). Fatal infection due to Haemophilus parasuis in a young wild boar (Sus scrofa). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 25*(2), 297-300.

Cuscoy, L. D. (1963). *Paletnologia de las islas Canarias*. Excmo. Cabildo Insular de Tenerife. Servicio de Investigaciones Arqueológicas.

Czerny, C. P., Osterkorn, K., Wittkowski, G., & Huber, M. (2000). [Meat juice ELISA for determination of Salmonella incidence in slaughter pig herds in Bavaria]. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, *114*(1-2), 35-39.

Daft, B., Nordhausen, R. W., Latimer, K. S., & Niagro, F. D. (1996). Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six-week-old pig. *Proc American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, *39*, 32.

Darwich, L. (2003). Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of General Virology*, 84(8), 2117-2125.

Darwich, L., Segales, J., & Mateu, E. (2004). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Archives of virology*, *149*(5), 857-874.

Davies, D. E., Wicks, J., Powell, R. M., Puddicombe, S. M., & Holgate, S. T. (2003). Airway remodeling in asthma: new insights. *Journal of allergy and clinical immunology*, *111*(2), 215-225.

Davies, P. R., Bahnson, P. B., Grass, J. J., Marsh, W. E., & Dial, G. D. (1995). Comparison of methods for measurement of enzootic pneumonia lesions in pigs. *American journal of veterinary research*, *56*(6), 9-14.

De Lange, K., Haddad, N., Le Potier, M. F., Agier, C., Le Vée, M., Amar, P., & Toma, B. (2003). Specificity of three ELISA-gE kits for screening pig meat for antibodies to Aujeszky's disease. *The Veterinary Record*, *153*(20), 621-624.

Dea, S., Bilodeau, R., Athanassious, R., Sauvageau, R. & Martineau, G.P. (1992). Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: Isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *The Canadian Veterinary Journal*, 33(12), 801.

DeBey, M.C. & Ross, R.F. (1994). Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection and immunity*, 62(12), 5312-5318.

DeBey, M.C., Jacobson, C.D. & Ross, R.F. (1992). Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *American journal of veterinary research*, 53(9), 1705-1710.

Dee, S. (1996). The porcine respiratory disease complex: Are subpopulations important? *Swine health and production*, 4, 147-149.

Dee, S. A., Joo, H. S., Polson, D. D., Park, B. K., Pijoan, C., Molitor, T. W., Collins, J.E., & King, V. (1997). Evaluation of the effects of nursery depopulation on the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and the productivity of 34 farms. *Veterinary record*, *140*, 247-248.

Dee, S., Otake, S. & Deen, J. (2010). Use of a production region model to assess the efficacy of various air filtration systems for preventing airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*: Results from a 2-year study. *Virus Research,* 154(1), 177-184.

Dee, S., Torremorell, M., Thompson, B., Deen, J. & Pijoan, C. (2005). An evaluation of thermo-assisted drying and decontamination for the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from contaminated livestock transport vehicles. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire,* 69(1), 58-63.

Dellmann, H.D., & Brown, E.M. (2006). *Textbook of veterinary histology*. Eurell, J.A. & Frappier, B.L. (eds). 6th edition. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA

Delventhal, S., Brandis, A., Ostertag, H. & Pabst, R. (1992a). Low incidence of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in chronically inflamed human lungs. *Virchows Archiv. B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, *62*(1), 271-274.

Delventhal, S., Hensel, A., Petzoldt, K. & Pabst, R. (1992b). Effects of microbial stimulation on the number, size and activity of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structures in the pig. *International Journal of Experimental Pathology*, *73*(3), 351.

Desrosiers, R. (2004). Epidemiology, diagnosis and control of swine diseases. *American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting* (Des Moines, Iowa), pp. 9-37.

Detmer, S.E., Patnayak, D.P., Jiang, Y., Gramer, M.R. & Goyal, S.M. (2011). Detection of Influenza A virus in porcine oral fluid samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *23*(2), 241-247.

Díaz, J., Paz, Y., Quesada-Canales, O., Rivero, M., Saavedra, P., Fernández, A. & Andrada, M. (2013). Comparison of ELISA Analysis from Serum and Lung Extract Samples of Pigs Infected Naturally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology,* 1(148), 77.

Docic, A., & Bilkei, G. (2001). The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on health and some production parameters in outdoor and indoor units. *Pig Journal*, *47*, 23-34.

Domenech, S.J., Poveda, J.B. & Espejo, S.J. (1995). Etiología de la neumonía micoplásmica porcina. *Porci*, 27, 13-17.

Done, S. H., Paton, D. J., Brown, I., Scott, A., & Cooley, W. (1992). Pathology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in the UK. In *Proceedings of the 12 th International Pig Veterinary Society Congress, The Netherlands*, *1*, 111.

Done, S.H. & Paton, D.J. (1995). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Veterinary Record,* 136(2), 32-35.

Donham, K. (1991). Association of environmental air contamination with disease and productivity in Swine. *American journal of veterinary research*, 52(10), 1723-1730.

Dorr, P. M., Baker, R. B., Almond, G. W., Wayne, S. R., & Gebreyes, W. A. (2007). Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *230*(2), 244-250.

Doster, A.R. & Lin, B.C. (1988). Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. *American journal of veterinary research*, 49(10), 1719-1721.

Drolet, R., & Dee, S.A., 1999. Diseases of the urinary system. In Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L. (eds.), Diseases *of swine*, *8,* 966–967. Iowa State University Press, Ames, USA.

Drolet, R., Cardinal, F., Houde, A., & Gagnon, C. A. (2011). Unusual central nervous system lesions in slaughter-weight pigs with porcine circovirus type 2 systemic infection. *The Canadian Veterinary Journal*, *52*(4), 394.

Drolet, R., D'Allaire, S., Larochelle, R., Magar, R., Ribotta, M., & Higgins, R. (2002). Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. *The Veterinary Record*, *150*(5), 139-143.

Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, B., & Magar, R. (2003). Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Veterinary Pathology Online*, *40*(2), 143-148.

Drolet, R., Thibault, S., D'Allaire, S., Thomson, J.R. & Done, S.H. (1999). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. *Swine health and production*, 7(6), 283-285.

Duan, X., Nauwynck, H.J. & Pensaert, M.B. (1997). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Archives of virology, 142*(12), 2483-2497.

Dungworth, D.L. (1993). The Respiratory System. In Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (Eds.) *Pathology of Domestic Animals*. Academic Press, Inc. U.S.A., pp. 539-699.

Dyce, K. M., Sack, W. O., & Wensing, C. J. G. (2010). *Textbook of veterinary anatomy*. Elsevier Health Sciences.

Ellis, J. A., Allan, G., & Krakowka, S. (2008). Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2–associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *American journal of veterinary research*, *69*(12), 1608-1614.

Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D. & Haines, D. (1998). Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian Veterinary Journal, 39*(1), 44-51.

Ellis, J., Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D., Bratanich, A., Clark, E., Allan, G., Konoby, C., Hassard, L., Meehan, B., Martin, K., Harding, J., Kennedy, S. & McNeilly, F. (1999b). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(1), 3-14.

Ellis, J., Spinato, M., Yong, C., West, K., McNeilly, F., Meehan, B., Kennedy, S., Clark, E., Krakowka, S., Allan, G., & Allan, G. (2003). Porcine circovirus 2–associated disease in Eurasian wild boar. *Journal of Veterinary*

Diagnostic Investigation,*15*(4), 364-368.

Ellis, J.A., Krakowa, S., Allan, G., Clark, E. & Kennedy, S. (1999a). "The clinical scope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection has expanded since 1987": an alternative perspective. *Veterinary Pathology*, 36(3), 262-265.

Epperson, B. & Holler, L. (1997). An abortion storm and sow mortality syndrome. *American Association of Swine Practitioners*, Quebec, Canada, 479-484.

Erlandson, K.R., Evans, R.B., Thacker, B.J., Wegner, M.W. & Thacker, E.L. (2005). Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production*, 13(4), 198-203.

Erle, D.J. & Pabst, R. (2000). Intraepithelial lymphocytes in the lung: a neglected lymphocyte population. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 22(4), 398-400.

Euzeby, J. (1993). The immune system of swine respiratory tract. A review. *Revue de Medecine Veterinaire,* 144(8-9), 665-681.

Evans, C.M., Medley, G.F. & Green, L.E. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in GB pig herds: farm characteristics associated with heterogeneity in seroprevalence. *BMC Veterinary Research*, 4(1), 48.

Fabisiak, M., K. Podgórska, E. Skrzypiec, A. Szczotka & T. Stadejek (2013). Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in meat juice samples from Polish wild boar (Sus scrofa L.). *Acta Veterinaria Hungarica,* 61(4), 529-536.

Fabisiak, M., Podgórska, K., Skrzypiec, E., Szczotka, A., & Stadejek, T. (2013). Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in meat juice samples from Polish wild boar (Sus scrofa L.). *Acta Veterinaria Hungarica*, *61*(4), 529-536.

Fabisiak, M., Szczotka, A., Podgorska, K. & Stadejek, T. (2012). Prevalence of infection and genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in wild boar (Sus scrofa) in Poland. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(3), 612-618.

Fablet, C., Marois, C., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J. P., Le Devendec, L., Kobisch, M., Madec, F., & Rose, N. (2012)a. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Research in veterinary science*,*93*(2), 627-630.

Fablet, C., Marois, C., Kobisch, M., Madec, F., & Rose, N. (2010). Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach.*Veterinary microbiology*, *143*(2), 238-245.

Fablet, C., Marois, C., Kuntz-Simon, G., Rose, N., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J. P., Le Devendec, L., Tocqueville, V., Quéguiner, S., Gorin, S., Kobisch, M., & Madec, F. (2011). Longitudinal study of respiratory infection patterns of breeding sows in five farrow-to-finish herds. *Veterinary microbiology*, *147*(3), 329-339.

Fablet, C., Marois-Créhan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Madec, F. & Rose, N. (2012)b. Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. *Veterinary Microbiology*, 157(1), 152-163.

Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S.B., Saalmuller, A. & Elbers, K. (2008). The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine*, 26(1), 1488-1499.

Fan, P., Wei, Y., Guo, L., Wu, H., Huang, L., Liu, J., & Liu, C. (2013). Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Virol J*, *10*, 265.

Fano, E., Pijoan, C. & Dee, S. (2005). Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 69(3), 223-228.

Fano, E., Pijoan, C., Dee, S. & Deen, J. (2007). Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research,* 71(3), 195-200.

FAO. 2007. La Situación de los Recursos Zoogenéticos Mundiales para la Alimentación y la Agricultura. Anim. Prod. Health Paper Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Roma. http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s00.htm.

Fawcett, D.W. (1995). *Bloom-Fawcett. Tratado de histología*. McGraw-Hill Interamericana.

Fenaux, M., Halbur, P.G., Haqshenas, G., Royer, R., Thomas, P., Nawagitgul, P., Gill, M., Toth, T.E. & Meng, X.J. (2002). Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: Characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *Journal of Virology*, 76(2), 541-551.

Fernández, A., Martín de las Mulas, J., Poveda, J.B., Toledo, V. & Méndez, A. (1989). Aplicación de técnicas inmunocitoquímicas al diagnóstico de la enfermedad de Aujezsky en material fijado. *Anaporc,* 76, 24-27.

Ferroglio, E., Rossi, L., & Gennero, S. (2000). Lung-tissue extract as an alternative to serum for surveillance for brucellosis in chamois. *Preventive Veterinary Medicine*, *43*(2), 117-122.

Fichtner, V.D., Beyer, J., Leopoldt, D., Schirrmeier, H., Bergmann, S. & Fischer, U. (1993). Experimentelle Reproduktion der respiratorischen verlaufsform der Infektion mit dem Erreger des seuchenhaften Spatabortes der Schweine. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift Journal*, 106(5), 145-149.

Fort, M., Fernandes, L. T., Nofrarias, M., Díaz, I., Sibila, M., Pujols, J., Mateu, E. & Segalés, J. (2009). Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Veterinary immunology and immunopathology*, *129*(1), 101-107.

Fournier, M., Lebargy, F., Le Roy Ladurie, F., Lenormand, E. & Pariente, R. (1989). Intraepithelial T-lymphocyte subsets in the airways of normal subjects and of patients with chronic bronchitis. *American Review of Respiratory Disease*, 140(3), 737-742.

Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarías, M. & Segalés, J. (2010). Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *The Veterinary Journal*, 184(3), 326-333.

Frey, M. L., Eernisse, K. A., Landgraf, J. G., Pearson, J. E., & Chladek, D. W. (1992). Diagnostic testing for SIRS virus at the National Veterinary Services Laboratories (NVSL). *American Association of Swine Practitioners Newsletter*, 4, 31.

Friis, N.F. (1971). Mycoplasmas cultivated from the respiratory tract of Danish pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 12(1), 69-79.

Galina, L., Pijoan, C., Sitjar, M., Christianson, W.T., Rossow, K. & Collins, J.E. (1994). Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Veterinary Record*, 134(3), 60-64.

Gama, L. T., Martínez, A. M., Carolino, I., Landi, V., Delgado, J. V., Vicente, A. A., Vega-Pla, J.L., Cortés, O., Sousa, C.O., & BIOPIG Consortium. (2013). Genetic structure, relationships and admixture with wild relatives in native pig breeds from Iberia and its islands. *Genetics Selection Evolution*, *45*, 18.

Ganz, T. (1999). Defensins and host defense. *Science*, 286(5439), 420-421.

García, C., Riera, R., Fabelo, F., & Gracía-Romero, C. (2011). Raza Cerdo Negro Canario. Ficha técnica. *Agricultura y Ganadería Ecológica. Revista de divulgación técnica*, *3*, 68.

García, T.B. (1999). *Endoparasitosis del porcino ibérico en extremadura (España): Epidemiología y control*. Universidad de Extremadura.

Garcia-Martin, M., & Capote, J. (1982). El Cerdo Negro Canario. *Cabildo Insular de La Palma*, 21.

Ghebremariam, M. K., & Gruys, E. (2005). Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs with particular emphasis on the causative agent, the mode of transmission, the diagnostic tools and the control measures. A review.*Veterinary quarterly*, *27*(3), 105-116.

Giger, T., Bruggmann, S. & Nicolet, J. (1977). Immunological technics for the determination of *Mycoplasma suipneumoniae* in frozen sections and bronchial smears. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, *119*(4), 125-134.

Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K. & Buechner-Maxwell, V. (2009). Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1151-1163.

Gilpin, D. F., McCullough, K., Meehan, B. M., McNeilly, F., McNair, I., Stevenson, L. S., Foster, J.C., Ellis, J. A., Krakowka, S., Adair, B. M. & Allan, G. M. (2003). In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Veterinary immunology and immunopathology*, *94*(3), 149-161.

Gipson, P.S., Veatch, J.K., Matlack, R.S. & Jones, D.P. (1999). Health status of a recently discovered population of feral swine in Kansas. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(3),624-627.

Girard, C., Morin, M. & El Azhary, Y. (1992). Experimentally induced porcine proliferative and necrotising pneumonia with an influenza A virus. *Veterinary Record*, 130(10), 206-207.

Gjurovski, I., Angelovski, B., Dovenski, T., Mitrov, D. & Ristoski, T. (2015). Diagnostic characteristics of circovirus infection in pigs. *Macedonian Veterinary Review*. 38(1), 73-78.

Goodwin, R.F.W. (1976). Improved medium for isolation of *Mycoplasma suipneumoniae. Veterinary Record*, *98*(13), 260-261.

Goodwin, R.F.W. (1985). Apparent Reinfection of Enzootic-Pneumonia-Free Pig Herds - Search for Possible Causes. *Veterinary Record*, *116*(26), 690-694.

Goodwin, R.F.W., Pomeroy, A.P. & Whittles, P. (1965). Production of Enzootic Pneumonia in pigs with Mycoplasma. *Veterinary Record*, *77*(42), 1247

Goovaerts, D. & Visser, N. (1992). Vascular lesions in pigs infected with PRRS. In Proceedings *International Pig Veterinary Society Congre*ss p. 12:129.

Goto, E., Kohrogi, H., Hirata, N., Tsumori, K., Hirosako, S., Hamamoto, J., Fujii, K., Kawano, O. & Ando, M. (2000). Human bronchial intraepithelial T lymphocytes as a distinct T-cell subset. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *22*(4), 405-411.

Gottschalk, M. & Taylor, D. J. (2006). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In Straw, B.E. , Zimmerman, J.L., D' Allaire, S., Taylor, D.J. (eds) *Diseases of Swine*, *9*(33), 563-576. Iowa State, Blackwell publishing.

Gourlay, R. N., & Howard, C. J. (1981). Respiratory mycoplasmosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, *26*, 289-332.

Goyal, S. M. (1993). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *5*(4), 656-664.

Gramer, M., Rossow, K., & Torrison J. (2005). A Guide to Porcine Sample Submission and Diagnostic Tests. *University of Minnesota, Veterinary Diagnostic Laboratory.*

Grasland, B., Loizel, C., Blanchard, P., Oger, A., Nignol, A. C., Bigarré, L., Morvan, H., Cariolet, R., & Jestin, A. (2005). Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. *Veterinary Research*, *36*(5-6), 685-697.

Grau-Roma, L., & Segalés, J. (2007). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Veterinary Microbiology*, *119*(2), 144-151.

Grau-Roma, L., Fraile, L., & Segalés, J. (2011). Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *The Veterinary Journal*, *187*(1), 23-32.

Grau-Roma, L., Hjulsager, C. K., Sibila, M., Kristensen, C. S., López-Soria, S., Enøe, C., Casal, J., Bøtner, A., Nofrarías, M., Hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segalés, J., & Larsen, L. E. (2009). Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Veterinary Microbiology*, *135*(3), 272-282.

Gresham, A., Giles, N., & Weaver, J. (2000). PMWS and porcine dermatitis nephropathy syndrome in Great Britain. *Veterinary Record*, *147*(4).

Greve, J. H. & P. Davies. (2012). External parasites. In Zimmerman, J. J. , Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., & Stevenson, G. W., (eds.) *Diseases of swine*, *10*, 885-896. John Wiley & Sons, Inc.

Grierson, S. S., King, D. P., Sandvik, T., Hicks, D., Spencer, Y., Drew, T. W., & Banks, M. (2004). Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Archives of virology*, *149*(6), 1171-1183.

Grierson, S. S., King, D. P., Sandvik, T., Hicks, D., Spencer, Y., Drew, T. W., & Banks, M. (2004). Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Archives of Virology*, *149*(6), 1171-1183.

Griffith, R.W., Schwartz, K.J. & Meyerholz, D.K. (2006). Salmonella. In Straw, B.E. , Zimmerman, J.L., D' Allaire, S., Taylor, D.J. (eds) *Diseases of Swine*, *9*(45), 739-754. Iowa State, Blackwell publishing. Griffith, R.W., Schwartz, K.J., Meyerholz, D.K., R.W. Griffith, K.J.S., & Meyerholz D.K. (2006). Salmonella, In: Straw, B.E., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of swine*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.

Groschup, M. H., Brun, A., & Haas, B. (1993). Serological Studies on the Potential Synergism of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Influenza-, Corona-and Paramyxoviruses in the Induction of Respiratory Symptoms in Swine.*Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *40*(1-10), 681-689.

Grosse Beilage, E., Rohde, N., & Krieter, J. (2009). Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Preventive Veterinary Medicine*, *88*(4), 255-263.

Ha, Y., Jung, K., & Chae, C. (2005). Lack of evidence of porcine circovirus type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea. *Veterinary Record*, *156*(12), 383-384.

Ha, Y., Lee, Y. H., Ahn, K. K., Kim, B., & Chae, C. (2008). Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Veterinary Pathology Online*, *45*(6), 842-848.

Haagsman, H. P., Hogenkamp, A., Van Eijk, M., & Veldhuizen, E. J. (2008). Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology*, *93*(4), 288-294.

Haines, D. M., Waters, E. H., & Clark, E. G. (1993). Immunohistochemical detection of swine influenza A virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *57*(1), 33.

Halbur, P. G., Paul, P. S., & Janke, B. H. (1993)a. Viral contributors to the porcine respiratory disease complex. In *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners* (pp. 343-350).

Halbur, P., Andrew, J., & Paul, P. (1995)a. Strain variation of PRRS virus: field and research experiences. In *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, 26,* 391-394).

Halbur, P.G. (1998). Porcine respiratory diseases. In: *15th International Pigs Veterinary Society Congress*, Birmingam, England, 1-10.

Halbur, P.G. (2001). Emerging and recurring diseases in growing pigs. In *Animal Health, Biotechnology and Trade, Annual Meeting of the National Institute for Animal Agriculture Proceedings, Colorado Springs, CO, USA* (Vol. 3).

Halbur, P.G., & Opriesnig, T. (2004). Vaccination and PCV2-associated diseases. *Pig International 34*, 23−25.

Halbur, P.G., Andrews, J.J., Huffman, E.L., Paul, P.S., Meng, X.J., & Niyo, Y. (1994). Development of a Streptavidin-Biotin Immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-antigen in porcine lung. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 6,* 254-257.

Halbur, P.G., Miller, L.D., Paul, P.S., Meng, X.J., Huffman, E.L., & Andrews, J.J. (1995)b. Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Veterinary Pathology Online*, *32*(2), 200-204.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Andrews, J.J., Sanderson, T.P., Ross, R.F., Schwartz, K.J., Frey, M.L., Erickson, B.J., Hill, H.T., & Hoffman, L.J. (1993)b. Experimental Transmission of an Apparent Viral Pneumonia in Conventional and Gnotobiotic Pigs. *Veterinary Record, 132,* 263-266.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J., & Rathje, J.A. (1995)c. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary Pathology Online*, *32*(6), 648-660.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Andrews, J.J., Lum, M.A., & Rathje, J. A. (1996)a. Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary Pathology Online*, *33*(2), 159-170.

Halbur, P.G., Paul, P.S., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J., & Rathje, J.A. (1996)b. Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *8*(1), 11-20.

Hälli, O., Ala-Kurikka, E., Nokireki, T., Skrzypczak, T., Raunio-Saarnisto, M., Peltoniemi, O. A., & Heinonen, M. (2012). Prevalence of and risk factors associated with viral and bacterial pathogens in farmed European wild boar. *The Veterinary Journal*, *194*(1), 98-101.

Hamel, A.L., Lin, L.L., & Nayar, G.P. (1998). Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*, *72*(6), 5262-5267.

Hamel, A.L., Lin, L.L., Sachvie,C., Grudeski, E., & Nayar, G.P. (2000). PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus.*Canadian Journal of Veterinary Research*, *64*(1), 44.

Hameleers, D.M.H., Stoop, A.E., Van der Ven, I., Biewenga, J., Van der Baan, S., & Sminia, T. (1989). Intra-epithelial lymphocytes and non-lymphoid cells in the human nasal mucosa. *International Archives of Allergy and Immunology*, *88*(3), 317-322.

Hammer, R., Ritzmann, M., Palzer, A., Lang, C., Hammer, B., Pesch, S., & Ladinig, A. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections in wild boar (Sus scrofa) in southwestern Germany. *Journal of wildlife diseases*, *48*(1), 87-94.

Hannan, P. C., Bhogal, B. S., & Fish, J. P. (1982). Tylosin tartrate and tiamutilin effects on experimental piglet pneumonia induced with pneumonic pig lung homogenate containing mycoplasmas, bacteria and viruses. *Research in veterinary science*, *33*(1), 76-88.

Hansen, M. S., Hjulsager, C. K., Bille-Hansen, V., Haugegaard, S., Dupont, K., Høgedal, P., Kunstmann, P., & Larsen, L. E. (2010)a. Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures. *Veterinary Microbiology*, *144*(1), 203-209.

Hansen, M. S., Pors, S. E., Bille-Hansen, V., Kjerulff, S. K. J., & Nielsen, O. L. (2010)b. Occurrence and tissue distribution of porcine circovirus type 2 identified by immunohistochemistry in Danish finishing pigs at slaughter. *Journal of Comparative Pathology*, *142*(2), 109-121.

Hansen, M. S., Pors, S. E., Jensen, H. E., Bille-Hansen, V., Bisgaard, M., Flachs, E. M., & Nielsen, O. L. (2010)c. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *Journal of Comparative Pathology*, *143*(2), 120-131.

Harding, J. C. (1996). Post-weaning multisystemic syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. In *Proceedings Western Canadian Association Swine Practitioners*, *21*.

Harding, J. C. (2004). The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Veterinary microbiology*, *98*(2), 131-135.

Harding, J. C., & Clark, E. G. (1997). Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Production*, *5*(5), 201-203.

Harding, J. C., Baker, C. D., Tumber, A., McIntosh, K. A., Parker, S. E., Middleton, D. M., Hill J.E., Ellis J.A., & Krakowka, S. (2008). Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, *20*(3), 274-282.

Harding, J. C., Clark, E. G., Strokappe, J. H., Willson, P. I., & Ellis, J. A. (1998). Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health and Production*, *6*, 249-256.

Hare, W.C.D. (2001)a. Sistema respiratorio. *Anatomía de los Animales Domésticos de Sisson y Grossman*, *5ª edición*, Tomo 1. Cap.8. (129-165). Masson, S.A.

Hare, W.C.D. (2001)b. Sistema respiratorio de los porcinos. *Anatomía de los Animales Domésticos de Sisson y Grossman*, *5ª edición*, Tomo 2. Cap.41. (1414-1429). Masson, S.A.

Harms, P. A., Halbur, P. G., & Sorden, S. D. (2002). Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal of Swine Health and Production*, *10*(1), 27-32.

Harms, P. A., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Bolin, S. R., Lager, K. M., Morozov, I., & Paul, P. S. (2001). Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology Online*, *38*(5), 528-539.

Haruna, J., Hanna, P., Hurnik, D., Ikede, B., Miller, L., & Yason, C. (2006). The role of immunostimulation in the development of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs under field conditions. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *70*(4), 269.

Haugegaard, J. (2010). Prevalence of nematodes in Danish industrialized sow farms with loose housed sows in dynamic groups. *Veterinary parasitology*,*168*(1), 156-159.

Haynes, J. S., Halbur, P. G., Sirinarumitr, T., Paul, P. S., Meng, X. J., & Huffman, E. L. (1997). Temporal and morphologic characterization of the distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by in situ hybridization in pigs infected with isolates of PRRSV that differ in virulence. *Veterinary Pathology Online*, *34*(1), 39-43.

Helie, P., Drolet, R., Germain, M. C., & Bourgault, A. (1995). Systemic necrotizing vasculitis and glomerulonephritis in grower pigs in southwestern Quebec. *The Canadian Veterinary Journal*, *36*(3), 150.

Hiemstra, P. S. (2007). The role of epithelial β-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Experimental lung research*, *33*(10), 537-542.

Hill, M. A., Scheidt, A. B., Teclaw, R. F., Clark, L. K., Knox, K. E., & Jordan, M. (1992). Association between growth indicators and volume of lesions in lungs from pigs at slaughter. *American Journal of Veterinary Research*, *53*(12), 2221-2223.

Hillen, S., von Berg, S., Köhler, K., Reinacher, M., Willems, H., & Reiner, G. (2014). Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies. *Preventive veterinary medicine*, *113*(4), 580-588.

Hinrichs, U., Ohlinger, V. F., Pesch, S., Wang, L., Tegeler, R., Delbeck, F. E. J., & Wendt, M. (1999). First report of porcine circovirus type 2 infection in Germany. *Tierarztliche umschau*, *54*(5), 255-258.

Hirai, T., Nunoya, T., Ihara, T., Kusanagi, K., & Shibuya, K. (2001). Dual infection with PCV-2 and porcine epidemic diarrhoea virus in neonatal piglets.*Veterinary Record*, *148*(15), 482-484.

Hirose, O., Kudo, H., Yoshizawa, S., Hiroike, T., & Nakane, T. (1995). Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Chiba prefecture. J*ournal of Japan Veterinary Medical Association*, *48*, 650-653.

Hohlfeld, J., Fabel, H., & Hamm, H. (1997). The role of pulmonary surfactant in obstructive airways disease. *European Respiratory Journal*, *10*(2), 482-491.

Holmgren, N. (1973). Immunoglobulins in normal porcine traceobronchila secretions. *Acta Veterinaria Scandinavica*.

Honnold, C. (1999). Porcine respiratory disease complex.

Hopper, S. A., White, M. E., & Twiddy, N. (1992). An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *The Veterinary Record*, *131*(7), 140-144.

Horter, D. C., Pogranichniy, R. M., Chang, C. C., Evans, R. B., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2002). Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary Microbiology*, *86*(3), 213-228.

Huang, Y. T., Chu, R. M., Liu, R. S., & Weng, C. N. (1990). Morphologic studies of intrapulmonary airway mucosa-associated lymphoid tissues in swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *25*(1), 13-22.

Iglesias, G., & Trujano, M. (2000). Diversos modelos de interacciones que ocurren en el complejo respiratorio porcino. *Vet. Méx*, *31*(1), 59.

Infocarne. (2006). http://www.infocarne.com/cerdo/razas_cerdo.asp

Jacobsen, B., Krueger, L., Seeliger, F., Bruegmann, M., Segalés, J., & Baumgaertner, W. (2009). Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Veterinary microbiology*, *138*(1), 27-33.

Jacques, M., Blanchard, B., Foiry, B., Girard, C., & Kobisch, M. (1992). In vitro colonization of porcine trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. In *Annales de recherches vétérinaires* (Vol. 23, No. 3, pp. 239-247).

Jakubek, E. B., Bröjer, C., Regnersen, C., Uggla, A., Schares, G., & Björkman, C. (2001). Seroprevalences of Toxoplasma gondii and Neospora caninum in Swedish red foxes (Vulpes vulpes).*Veterinary Parasitology*, *102*(1), 167-172.

Jakubek, E. B., Mattsson, R., Mörner, T., Mattsson, J. G., & Gavier-Widén, D. (2012). Potential application of serological tests on fluids from carcasses: detection of antibodies against Toxoplasma gondii and Sarcoptes scabiei in red foxes (Vulpes vulpes). *Acta Veterinaria Scandinavica*, *54*, 13.

Jeffery, P. K. (2001). Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *164*(supplement_2), S28-S38.

Jensen, T. K., Vigre, H., Svensmark, B., & Bille-Hansen, V. (2006). Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by Lawsonia intracellularis. *Journal of Comparative Pathology*, *135*(4), 176-182.

Jericho, K. W., Done, S. H., & Saunders, R. W. (1975). Pneumonia and efficiency of pig production.*The Canadian Veterinary Journal*, *16*(2), 44.

Jirawattanapong, P., Stockhofe-Zurwieden, N., van Leengoed, L., Wisselink, H., Raymakers, R., Cruijsen, T., van der Peet-Schwering, C., Nielen, M., & van Nes, A. (2010). Pleuritis in slaughter pigs: Relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis. *Research in veterinary science*, *88*(1), 11-15.

Johnson, C. S., Joo, H. S., Direksin, K., Yoon, K. J., & Choi, Y. K. (2002). Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *14*(6), 507-512.

Jolie, R., Bäckström, L., Pinckney, R., & Olson, L. (1998). Ascarid infection and respiratory health in feeder pigs raised on pasture or in confinement. *Swine Health and Production*, *6*, 115-120.

Jolie, R., Olson, L., & Bäckström, L. (2000). Bronchoalveolar lavage cytology and hematology: a comparison between high and low health status pigs at three different ages. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *12*(5), 438-443.

Jong, M.F. (2006). Progressive and Nonprogressive Atrophic Rhinitis, In: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Disease of swine*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.

Jost, B. H., & Billington, S. J. (2005). *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie van Leeuwenhoek*, *88*(2), 87-102.

Kapur, V., Elam, M. R., Pawlovich, T. M., & Murtaugh, M. P. (1996). Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *Journal of General Virology*, *77*(6), 1271-1276.

Kay, R. M., Done, S. H., & Paton, D. J. (1994). Effect of sequential porcine reproductive and respiratory syndrome and swine influenza on the growth and performance of finishing pigs. *The Veterinary Record*, *135*(9), 199-204.

Keffaber, K. K. (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *American Association of Swine Practitioners Newsletter*, *1*, 1-9.

Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., & Allan, G. (2000). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology, 122*, 9-24.

Kennedy, S., Segalés, J., Rovira, A., Scholes, S., Domingo, M., Moffett, D., Meehan, B., O'Neill, R., McNeilly, F., & Allan, G. (2003). Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 15*, 151-156.

Kim, C. F. B., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R., & Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, *121*(6), 823-835.

Kim, H. K., Lee, C. S., Kang, B. K., Yeom, M. J., Moon, H. J., Park, S. J., Nguyen, V.G., Song, D.S., & Park, B. K. (2011). Experimental infection of a newly emerging Korean type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate in colostrum-deprived pigs. *Virology journal*, *8*(1), 1-6.

Kim, J., & Chae, C. (2001). Differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridisation. *Research in Veterinary Science*, *70,* 265-269.

Kim, J., & Chae, C. (2003). Multiplex nested PCR compared with *in situ* hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *67*(2), 133.

Kim, J., & Chae, C. (2004). A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfected pigs. *Journal of veterinary diagnostic investigation*,*16*(1), 45-50.

Kim, J., & Chae, C. (2005). Necrotising lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 in pigs. *The Veterinary Record*, *156*(6), 177-178.

Kim, J., Choi, C., & Chae, C. (2003)a. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, *128*(1), 52-59.

Kim, J., Chung, H. K., & Chae, C. (2003)b. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal*,*166*(3), 251-256.

Kim, J., Chung, H.K., Jung, T., Cho, W.S., Choi, C., Chae, C. (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *Journal of Veterinary Medical Science*, *64*(1), 57-62

Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., & Chae, C. (2004)a. Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Canadian journal of veterinary research*,*68* (3), 218.

Kim, J., Han, D. U., Choi, C., & Chae, C. (2001). Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*, *98*(1), 25-31.

Kim, J., Jung, K., & Chae, C. (2004)b. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *The Veterinary Record*, *155*, 489-492.

King, J. M. (1989). *The necropsy book*. New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University.

Kirkland, P.D., & Stephano, A. (2006). Paramyxoviruses: Rubulavirus, Menangle and Nipah Virus Infections, In: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of swine. Blackwell Publishing, Ames, Iowa*.

Kiss, I., Kecskeméti, S., Tuboly, T., Bajmócy, E., & Tanyi, J. (2000). New pig disease in Hungary: postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. *Acta Veterinaria Hungarica*, *48*(4), 469-475.

Kittawornrat, A., Panyasing, Y., Goodell, C., Wang, C., Gauger, P., Harmon, K., Rauh, R., Desfresne, L., Levis, I., & Zimmerman, J. (2014). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) surveillance using pre-weaning oral fluid samples detects circulation of wild-type PRRSV. *Veterinary microbiology*, *168*(2), 331-339.

Kittawornrat, A., Panyasing, Y., Goodell, C., Wang, C., Gauger, P., Harmon, K., Rauh, R., Desfresne, L., Levis, I., & Zimmerman, J. (2014) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) surveillance using pre-weaning oral fluid samples detects circulation of wild-type PRRSV. *Veterinary Microbiology*, *168*(2), 331-339.

Kittawornrat, A., Prickett, J., Wang, C., Olsen, C., Irwin, C., Panyasing, Y., Ballagi, A., Rice, A., Main, R., & Zimmerman, J. (2012). Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *24*(2), 262-269.

Kittawornrat, A., Prickett, J., Wang, C., Olsen, C., Irwin, C., Panyasing, Y., Ballagi, A., Rice, A., Main, R., Johnson, J., Rademacher, C., Hoogland, M., Rowland, R., & Zimmerman, J. (2012). Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *24*(2), 262-269.

Kiupel, M., Stevenson, G. W., Mittal, S. K., Clark, E. G., & Haines, D. M. (1998). Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Veterinary Pathology Online*, *35*(4), 303-307.

Kiupel, M., Stevenson, G.W., Kanitz, C.L., Anothayanontha, L., Latimer, K.S., & Mittal, S.K. (1999). Cellular localization of porcine circovirus in postweaning pigs with chronic wasting disease. *European Journal of Veterinary Pathology* 5, 77-82.

Kleiboeker, S.B. (2006). Porcine Adenovirus, In: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of swine. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.*

Klein, S., Wendt, M., Baumgärtner, W., & Wohlsein, P. (2010). Systemic toxoplasmosis and concurrent porcine circovirus-2 infection in a pig. *Journal of comparative pathology*, *142*(2), 228-234.

Kluge, J.P., Beran, G.W., Hill, H.T., Plattk, B. (1992). Pseudorabies (Aujeszky's disease), In: Leman, A.D., Straw, B., Mengueling, W., S.D., A., D., T. (Eds.) *Diseases of swine. Iowa state University Press, Ames, Iowa, pp*. 312-323.

Knell, S., Willems, H., Hertrampf, B., & Reiner, G. (2005). Comparative genetic characterization of porcine circovirus type 2 samples from German wild boar populations. *Veterinary Microbiology*, *109*(3), 169-177.

Kobisch, M. (1987). Respiratory Mycoplasmosis of the Pig. *Recueil De Medecine Veterinaire, 163,* 419-430.

Kobisch, M., Blanchard, B., & Le Potier, M. F. (1993). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Veterinary research*, *24*(1), 67-77.

Kobisch, M., Friis, N.F., 1996, Swine mycoplasmoses. Rev Sci Tech OIE 15, 1569-1605.

Kobisch, M., Tillon, J.P., & Vannier, P. (1978). *Mycoplasma-suipneumoniae* Enzootic Pneumonia in Pig - Rapid diagnosis and research of antibodies. *Recueil De Medecine Veterinaire* 154, 847-852.

Koenen, F. (2006). Encephalomyocarditis Virus, In: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of swine. Blackwell Publishing, Ames, Iowa*.

König, H. E., & Liebich, H. G. (2005). Aparato respiratorio. In *Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color* (Vol. 2). Ed. Médica Panamericana. pp. 81-102

Krakowka, S., & Ellis, J. A. (2008). Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. *American journal of veterinary research*, *69*(12), 1623-1629.

Krakowka, S., Ellis, J. A., McNeilly, F., Gilpin, D., Meehan, B., McCullough, K., & Allan, G. (2002). Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunology*, *15*(4), 567-582.

Krakowka, S., Ellis, J. A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D. M., & Allan, G. (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Veterinary Pathology Online*, *38*(1), 31-42.

Krakowka, S., Ellis, J. A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., & Allan, G. (2000). Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Pathology Online*, *37*(3), 254-263.

Krakowka, S., Hartunian, C., Hamberg, A., Shoup, D., Rings, M., Zhang, Y., Allan, G., Ellis, J.A. (2008). Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *American Journal of Veterinary Research*, *69*(12), 1615-1622.

Krejci, J., Nechvatalova, K., Blahutkova, M., & Faldyna, M. (2013). The respiratory tract in pigs and its immune system: a review. *Veterinarni Medicina*,*58*(4), 206-220.

Krejci, J., Nechvatalova, K., Kudlackova, H., Faldyna, M., Kucerova, Z., & Toman, M. (2005). Systemic and local antibody responses after experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in piglets with passive or active immunity. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *52*(4), 190-196.

Kristensen, B. (1995). Possible influence of the parental MHC class I type on survival of offspring from sows with natural PRRS-virus infection. In: *International symposium on Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*, p. 44.

Kubo, M., Kimura, K., Kobayashi, M., Shimizu, M., Yamada, S., Morozumi, T., Kobayashi, H., Mitani, K., Ito, N., Yamamoto, K., Miura, Y., Yamamoto, T., & Watanabe, K. (1995). Pathological studies on natural and experimental porcine pneumonia caused by porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Japan agricultural research quarterly 29*, 201-205.

Kukushkin, S., Kanshina, A., Timina, A., Baybikov, T., & Mikhalishin, V. (2008). Investigation of wild boar (Sus scrofa) for porcine reproductive and respiratory syndrome in some territories of Russia. *European Journal of Wildlife Research*, *54*(3), 515-518.

Kwon, D., & Chae, C. (1999). Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe.*Veterinary Pathology Online*, *36*(4), 308-313.

Kwon, D., Choi, C., & Chae, C. (2002). Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Veterinary Pathology Online*, *39*(5), 584-587.

Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Nielsen, J., Stadejek, T., Storgaard, T., Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Allan, G., & Botner, A. (2002). Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*, *89*(2), 97-114.

Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Nielsen, J., Storgaard, T., Botner, A., Allan, G., & McNeilly, F. (2001). Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *The Veterinary Record*, *148,* 759-760.

Lager, K. M., & Halbur, P. G. (1996). Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *8*(3), 275-282.

Lai, M., Zhou, R. Q., Huang, H. C., & Hu, S. J. (2011). Prevalence and risk factors associated with intestinal parasites in pigs in Chongqing, China.*Research in veterinary science*, *91*(3), e121-e124.

Lainson, F. A., Aitchison, K. D., Donachie, W., & Thomson, J. R. (2002). Typing of Pasteurella multocida isolated from pigs with and without porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(2), 588-593.

Lamontagne, L., Pagé, C., Larochelle, R., & Magar, R. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8high T cells. *Viral immunology*, *16*(3), 395-406.

Lamontagne, L., Page, C., Larochelle, R., Longtin, D., & Magar, R. (2001). Polyclonal activation of B cells occurs in lymphoid organs from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, *82*(3), 165-182.

Lang, C.S., Barz, A., Ladinig, A., Langhoff, R., Weissenböck, H., Kekarainen, T., Segales, J., Ritzmann, M. (2010).

Association between TTV genogroups 1 and 2 and PCV2 as well as various respiratory pathogens – a retrospective study. *In Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress*. Vancouver, Canada.

Larochelle, R., & Magar, R. (1995). Comparison of immunogold silver staining (IGSS) with two immunoperoxidase staining systems for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens in formalin-fixed tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *7*(4), 540-543.

Larochelle, R., & Magar, R. (1997). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in paraffin-embedded tissues: comparison of immunohistochemistry and in situ hybridization. *Journal of Virological Methods*, *63*(1), 227-235.

Larochelle, R., Magar, R., & D'Allaire, S. (2002). Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Research*, *90*(1), 101-112.

Larochelle, R., Magar, R., & D'Allaire, S. (2003). Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *67*(2), 114.

Larochelle, R., Mardassi, H., Dea, S., & Magar, R. (1996). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *8*(1), 3-10.

Larochelle, R., Sauvageau, R., & Magar, R. (1994). Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Quebec. *The Canadian Veterinary Journal*, *35*(8), 513.

Laude, H., Van Reeth, K., & Pensaert, M. (1993). Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Veterinary Research*, *24*(2), 125-150.

Lawson, S. R., Rossow, K. D., Collins, J. E., Benfield, D. A., & Rowland, R. R. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection. *Virus Research*, *51*(2), 105-113.

Lawton, D. E. B., Rawdon, T., Bastianello, S. S., Johnstone, A. C., & Morris, R. S. (2004, June). PMWS in New Zealand, part 1: diagnosis and investigation. In *Proceedings of the 18th Congress. International Pig Veterinary Society, Hamburg, Germany*.

Le Dividich, J., Herpin, P., & Rosario-Ludovino, R. M. (1994). Utilization of colostral energy by the newborn pig. *Journal of animal science*, *72*(8), 2082-2089.

Leon, E. A., Madec, F., Taylor, N. M., & Kobisch, M. (2001). Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. *Veterinary Microbiology*, *78*(4), 331-341.

Li, X., Jiang, P., Wang, Y., Li, Y. F., Chen, W., Wang, X. W., & Li, P. (2009). Genotyping of Haemophilus parasuis from diseased pigs in China and prevalence of two coexisting virus pathogens.*Preventive veterinary medicine*, *91*(2), 274-279.

Li, X., Shu, R., Filippatos, G., & Uhal, B. D. (2004). Apoptosis in lung injury and remodeling. *Journal of Applied Physiology*, *97*(4), 1535-1542.

Liebler-Tenorio, E. M., & Pabst, R. (2006). MALT structure and function in farm animals. *Veterinary Research*, *37*(3), 257-280.

Lin, C. M., Jeng, C. R., Hsiao, S. H., Liu, J. P., Chang, C. C., Chiou, M. T., Tsai, Y.C.., Chia, M.Y., & Pang, V. F. (2011). Immunopathological characterization of porcine circovirus type 2 infection-associated follicular changes in inguinal lymph nodes using high-throughput tissue microarray. *Veterinary microbiology*, *149*(1), 72-84.

Lipej, Z., Segalés, J., Jemersic, L., Olvera, A., Roic, B., Novosel, D., Mihaljevic, Z., & Manojlović, L. (2007). First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (Sus scrofa) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. *Acta Veterinaria Hungarica*, *55*(3), 389-404.

Liu, C. H., Wang, H. C., Su, F. C., & Fu, C. H. (1997). A modified immunohistochemical staining employed in formalin-fixed, paraffin-embedded porcine tissue sections. *Journal-Chinese Society of Veterinary Science*, *23*, 523-530.

Lium, B. M., & Falk, K. (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *32*, 55-65.

Livingston, C.W., Stair, E.L., Underdah, N., & Mebus, C.A. (1972). Pathogenesis of Mycoplasmal Pneumonia in swine. *American Journal of Veterinary Research 33,* 2249-&.

Lloyd, L. C., Cottew, G. S., & Anderson, D. A. (1989). Protection against enzootic pneumonia of pigs: intraperitoneal inoculation with live LKR strain of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Australian Veterinary Journal*, *66*(1), 9-12.

Loftager, M. K., Eriksen, L., & Nielsen, R. (1993). Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in mucosal secretions and sera of infected pigs as demonstrated by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Research in Veterinary Science*, *54*(1), 57-62.

López, A. (2007). Respiratory System. In, McGavin, M. D. & Zachary, J. F., (eds). *Pathologic basis of Veterinary Disease.* MOSBY Elsevier. 4th ed. pp. 463-558.

López, A. (2009). Patologia general del bronquio, bronquiolo y alveolo. http://people.upei.ca/lopez/castellano/lugo/notas/notas.html

López, J. L., Arguello, A., Capote, J., & Darmanim, N. (1992). Contribution to the study of Black Canary Pig. *Archivos de Zootecnia*, *41*, 531-6.

López-Soria, S., Maldonado, J., Riera, P., Nofrarias, M., Espinal, A., Valero, O., Blanchard, P., Jestin, A., Casal, J., Domingo, M., Artigas, C., Segales, J. (2010). Selected Swine viral pathogens in indoor pigs in Spain. Seroprevalence and Farm-Level Characteristics. *Transboundary and Emerging Diseases*, *57*(3), 171-179.

Lorenzo, H., Quesada, Ó., Assunçao, P., Castro, A., & Rodríguez, F. (2006). Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *109*(3), 199-207.

Loula, T. (1991). Mystery pig disease. Agri-practice,12(1), 23-34.

Lowe, J., Payne, B., Haag, A., & Wolter, B. (2004). Characterization of and risk factors for mortality in grow finish pigs 10 to 20 weeks post weaning. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*, 525–526. Des Moines, Iowa, (USA).

Lunney, J. K., Benfield, D. A., & Rowland, R. R. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Research*,*154*(1), 1-6.

Madec, F., & Kobish, M. (1982). Bilan lesionnel des poumons de porcs charcutiers al'abattoir. In *14. Journees de la Recherche Porcine en France. Paris (France).*

Madson, D. M., Patterson, A. R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X. J., & Opriessnig, T. (2009). Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology Online*, *46*(4), 707-716.

Maes, D. (1997) Descriptive epidemiological aspects of the seroprevalence of five respiratory disease agents in slaughter pigs from fattening pigs herds. *Epidemiol. Sante Anim.*, 31-32.

Maes, D. (2010). Mycoplasma pneumoniae infections in pigs: Update on epidemiology and control. In *Proceedings of the 21st International Pig Veteterinary Society.* 30-35. Vancouver, (Canada).

Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., & Haesebrouck, F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs.*Veterinary microbiology*, *126*(4), 297-309.

Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., & Haesebrouck, F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology*, *126*(4), 297-309.

Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., & de Kruif, A. (1996). Enzootic pneumonia in pigs. *Veterinary Quarterly*, *18*(3), 104-109.

Magar, R., Larochelle, R., Robinson, Y., & Dubuc, C. (1993). Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *57*(4), 300.

Magar, R., Larochelle, R., Thibault, S., & Lamontagne, L. (2000)a. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *Journal of Comparative Pathology 123*, 258-269.

Magar, R., Muller, P., & Larochelle, R., (2000)b. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. Canadian *Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire 64,* 184-186.

Magar, R., Robinson, Y., Dubuc, C., & Larochelle, R. (1995). Evaluation of the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig carcases. *Veterinary Record*, *137*(22), 559-561.

MAGRAMA. http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/peligro-extincion/porcino/negra-canaria/default.aspx

Maldonado, J., Segalés, J., Martınez-Puig, D., Calsamiglia, M., Riera, P., Domingo, M., & Artigas, C. (2005). Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *The Veterinary Journal*, *169*(3), 454-456.

Maldonado, J., Van Reeth, K., Riera, P., Sitjà, M., Saubi, N., Espuña, E., Artigas, C. (2006). Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *The Veterinary Journal 172,* 377-381.

Mardassi, H., Wilson, L., Mounir, S., & Dea, S. (1994). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *Journal of Clinical microbiology*, *32*(9), 2197-2203.

Maré, C.J., & Switzer, W.P. (1965). New species: *Mycoplasma hyopneumoniae* a causative agent of virus pig pneumonia. *Veterinary Medicine 60,* 841-846.

Marinou, K. A., Papatsiros, V. G., Gkotsopoulos, E. K., Odatzoglou, P. K., & Athanasiou, L. V. (2015). Exposure of extensively farmed wild boars *(Sus scrofa scrofa)* to selected pig pathogens in Greece. *Veterinary Quarterly*, *35*(2), 97-101.

Marois C, Tocqueville, V., Le Potier, MF., Hars, J., & Kobish, M. (2008). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* en French wild boars. In: *20th International Pig Veterinary Society Congress: 2008; Durban, South Africa*.

Marois, C., Dory, D., Fablet, C., Madec, F., & Kobisch, M. (2010). Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(5), 1523-1533.

Marois, C., Le Carrou, J., Kobisch, M., & Gautier-Bouchardon, A.V. (2007). Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Veterinary Microbiology 120,* 96-104.

Marrack, P., & Kappler, J. (1986). The antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted receptor on T cells. *Advances in Immunology*, *38*(1), 30.

Marruchella, G., Paoletti, B., Speranza, R., & Di Guardo, G. (2012). Fatal bronchopneumonia in a Metastrongylus elongatus and Porcine circovirus type 2 co-infected pig. *Research in veterinary science*,*93*(1), 310-312.

Marsteller, T. A., & Fenwick, B. (1999). *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. *Swine health and production*, *7*, 161-166.

Martelli, P., Terreni, M., Guazzetti, S., & Cavirani, S. (2006). Antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*,*53*(5), 229-233.

Martínez, A. M., Quiroz, J., Marques, J. R., & Delgado, J. V. (2007). Study of the genetic diversity of the Canary Black Pig using DNA microsatellites. *Archivos de Zootecnia*, *56*, 425.

Martínez, J., Peris, B., Gómez, E. A., & Corpa, J. M. (2009). The relationship between infectious and non-infectious herd factors with pneumonia at slaughter and productive parameters in fattening pigs. *The Veterinary Journal*, *179*(2), 240-246.

Martínez, J., Segalés, J., Aduriz, G., Atxaerandio, R., Jaro, P., Ortega, J., Peris, B., & Corpa, J. M. (2006). Pathological and aetiological studies of multifocal interstitial nephritis in wasted pigs at slaughter.*Research in veterinary science*, *81*(1), 92-98.

Mattsson, J. G., Bergström, K., Wallgren, P., & Johansson, K. E. (1995). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(4), 893-897.

McLaughlin, R. F., Tyler, W. S., & Canada, R. O. (1961). A study of the subgross pulmonary anatomy in various mammals. *American Journal of Anatomy*,*108*(2), 149-165.

McNair, I., Marshall, M., McNeilly, F., Botner, A., Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Vincent, I., Herrmann, B., Sanchez, R., & Rhodes, C. (2004). Interlaboratory testing of porcine sera for antibodies to porcine circovirus type 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *16*(2), 164-166.

McNeilly, F., Kennedy, S., Moffett, D., Meehan, B.M., Foster, J.C., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Adair, B.M., & Allan, G.M. (1999). A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Virological Methods, 80,* 123-128.

Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S., & Todd, D. (1997). Sequence of porcine circovirus DNA: Affinities with plant circoviruses. *Journal of General Virology, 78,* 221-227.

Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., & Allan, G.M. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology, 79,* 2171-2179.

Meemken, D., Tangemann, A. H., Meermeier, D., Gundlach, S., Mischok, D., Greiner, M., Klein G., & Blaha, T. (2014). Establishment of serological herd profiles for zoonoses and production diseases in pigs by "meat juice multi-serology". *Preventive Veterinary Medicine, 113,* 589-598.

Meerts, P., Gucht, S. V., Cox, E., Vandebosch, A., & Nauwynck, H. J. (2005). Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral immunology*, *18*(2), 333-341.

Mengeling, W. L., Lager, K. M., & Vorwald, A. C. (1994). Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *American Journal of Veterinary Research*, *55*(10), 1391-1398.

Mengeling, W. L., Lager, K. M., & Vorwald, A. C. (1996)a. An overview on vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome. In *Proceedings Allen D. Leman Swine Conference* (Vol. 23, pp. 139-142).

Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., Lager, K.M., & Brockmeier, S.L. (1996)b. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome using infected alveolar macrophages collected from live pigs (vol 49, pg 105, 1996). *Veterinary Microbiology* 52, 317-317.

Mensik, J., Franz, J., Pospisil, Z., & Krejci, J. (1971)a. The local transport of antibodies in the protection of calves and piglets against viral respiratory infection. *Acta Veterinaria Brno*, *40*, 75-81.

Mensik, J., Pospisil, Z., Franz, J., & Dreslerova, Z. (1971)b. Local effect of passively acquired colostral antibody on the development of experimental swine influenza infection in suckling pigs. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, *18*(10), 804-818.

Meredith, M. S. (1995). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS), In: *Pig Disease and Information Centre*. Cambridge, pp. 3-12.

Merialdi, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Luppi, A., Gozio, S., Pozzi, P., Spaggiari, B., & Martelli, P. (2012). Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *The Veterinary Journal*, *193*(1), 234-239.

Meulenberg, J. J., Petersen-Den Besten, A., De Kluyver, E. P., Moormann, R. J., Schaaper, W. M., & Wensvoort, G. (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*, *206*(1), 155-163.

Meyns, T., Dewulf, J., De Kruif, A., Calus, D., Haesebrouck, F., & Maes, D. (2006). Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine*, *24*(49), 7081-7086.

Meyns, T., Maes, D., Dewulf, J., Vicca, J., Haesebrouck, F., & de Kruif, A. (2004). Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. *Preventive Veterinary Medicine*, *66*(1), 265-275.

Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Haesebrouck, F., & Maes, D. (2011). A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *The Veterinary Journal*, *187*(3), 388-392.

Mikami, O., Nakajima, H., Kawashima, K., Yoshii, M., & Nakajima, Y. (2005). Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet. *Journal of Veterinary Medical Science 67,* 735-738.

Misinzo, G., Meerts, P., Bublot, M., Mast, J., Weingartl, H. M., & Nauwynck, H. J. (2005). Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *Journal of general virology*, *86*(7), 2057-2068.

Moennig, V. (1992). [Changes in the dynamics of viral infectious diseases]. *DTW. Deutsche tierarztliche Wochenschrift*, *99*(7), 290-292.

Molina, A. (2010). Biodiversidad y conservación de razas autóctonas de animales domésticos. *Ambienta: la revista del Ministerio de Medio Ambiente*, (91), 109-125.

Molina, R. M., Chittick, W., Nelson, E. A., Christopher-Hennings, J., Rowland, R. R., & Zimmerman, J. J. (2008). Diagnostic performance of assays for the detection of anti-porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies in serum and muscle transudate ("meat juice") based on samples collected under experimental conditions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *20*(6), 735-743.

Montagnaro, S., Sasso, S., De Martino, L., Longo, M., Iovane, V., Ghiurmino, G., Pisanelli, G., Nava, D., Baldi, L., & Pagnini, U. (2010). Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar *(Sus scrofa)* in Campania Region, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, *46*(1), 316-319.

Morales, J., Borzollino, M.A.A., Espinosa, A.A., Quesada, O., Cano, F.G., Súarez-Trujillo, A., & Santana, M.A.R.(2011). Estudio histoquímico del músculo longísimo lumbar del cerdo negro canario: datos preliminares sobre tipificación fibrilar. *Anaporc: Revista de la Asociación de Porcinocultura Científica*, *8*(85), 28-33.

Morandi, F., Ostanello, F., Fusaro, L., Bacci, B., Nigrelli, A., Alborali, L., Dottori, M., Vezzoli, F., Barigazzi, G., Fiorentini, L., Sala, V., Leotti, G., Joisel, F., & Sarli, G. (2010). Immunohistochemical detection of aetiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in Italian pigs. *Journal of Comparative Pathology*, *142*(1), 74-78.

Morandi, F., Panarese, S., Verin, R., Ostanello, F., Benazzi, C., & Sarli, G. (2012). PCV2-DNA in formalin-fixed and paraffin embedded lymph nodes of wild boar (Sus scrofa ssp. scrofa): one sampling approach for two laboratory techniques. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *54*(1), 1-3.

Moreau, I. A., Miller, G. Y., & Bahnson, P. B. (2004). Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine on pigs naturally infected with *M. hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*, *22*(17), 2328-2333.

Morgan, K. L., Hussein, A. M., Newby, T. J., & Bourne, F. J. (1980). Quantification and origin of the immunoglobulins in porcine respiratory tract secretions. *Immunology*, *41*(3), 729.

Mori, M., Sato, K., Akachi, S., Asahi, S., Taniguchi, S., & Narita, M. (2000). Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989. *Veterinary Pathology Online*, *37*(6), 667-669.

Morin, M., Girard, C., ElAzhary, Y., Fajardo, R., Drolet, R., & Lagace, A. (1990). Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: a newly recognized disease. *The Canadian Veterinary Journal*, *31*(12), 837.

Mörner, T., Sandström, G., Mattsson, R., & Nilsson, P. O. (1988). Infections with Francisella tularensis biovar palaearctica in hares (Lepus tumidus, Lepus europaeus) from Sweden. *Journal of wildlife diseases*, *24*(3), 422-433.

Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Morgan, M. K., Yoon, K. J., & Paul, P. S. (1998). Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome.*Journal of Clinical Microbiology*, *36*(9), 2535-2541.

Morris, C. R., Gardner, I. A., Hietala, S. K., Carpenter, T. E., Anderson, R. J., & Parker, K. M. (1995b). Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Preventive veterinary medicine*, *21*(4), 323-337.

Morris, C.R., Gardner, I.A., Hietala, S.K., & Carpenter, T.E. (1995a). Enzootic pneumonia - Comparison of cough and lung lesions as predictors of weight-gain in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire 59,* 197-204.

Morrison, R. B., Pijoan, C., & Leman, A. D. (1986). Association between enzootic pneumonia and performance. *Pig news and information*, *7*(1), 23-34.

Morrison, R. B., Pijoan, C., Hilley, H. D., & Rapp, V. (1985). Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Canadian journal of comparative medicine*, *49*(2), 129.

Morrison, R., Bautista, E., Goyal, S., Collins, J., & Annelli, J. (1992). Seroprevalence of SIRS virus in the United States in 1990. *AASP Newsletter*, *4*(4), 47.

Mortensen, S., Strandbygaard, B., Bøtner, A., Feld, N., & Willeberg, P. (2001). Monitoring porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection status in swine herds based on analysis of antibodies in meat juice samples. *Veterinary research*, *32*(5), 441-453.

Mostov, K., & Kaetzel, C. S. (1999). Immunoglobulin transport and the polymeric immunoglobulin receptor. In: Ogra, P.L., M.J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R. (eds.) *Mucosal Immunology*. Academic Press, San Diego, pp. 181-212.

Motovski, A. (2004). Enzootic (mycoplasmal) pneumonia of swine. *Veterinarna sbirka*, (7-8), 8-9.

Mousing, J., & Christensen, G. (1992). Pathological lesions in the right and left porcine lung: evaluation of an alternative method for scoring pneumonic lesions based on right lung examination. *Acta veterinaria Scandinavica*, *34*(2), 151-158.

Muñóz, A., Pallarés, F. J., & Ramis, G. (2007). *Práctica clínica en porcinocultura: análisis y abordaje de casos clínicos*. Acalanthis.

Murtaugh, M. P., Elam, M. R., & Kakach, L. T. (1995). Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Archives of virology*, *140*(8), 1451-1460.

Nakagawa, M., Yoshihara, S., Suda, H., & Ikeda, K. (1982). Pathological studies on white spots of the liver in fattening pigs. *National Institute of Animal Health quarterly*, *23*(4), 138-149.

Nakakuki, S. (1994). Bronchial tree, lobular division and blood vessels of the pig lung. *Journal of Veterinary Medicine Sciences*, *56*(4), 685-689.

Nawagitgul, P., Harms, P. A., Morozov, I., Thacker, B. J., Sorden, S. D., Lekcharoensuk, C., & Paul, P. S. (2002). Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, *9*(1), 33-40.

Nechvatalova, K., Kudlackova, H., Leva, L., Babickova, K., & Faldyna, M. (2011). Transfer of humoral and cell-mediated immunity via colostrum in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*,*142*(1), 95-100.

Neumann, E. J., Hall, W. F., Stevenson, M. A., Morris, R. S., & Ling Min Than, J. (2014). Descriptive and temporal analysis of post-mortem lesions recorded in slaughtered pigs in New Zealand from 2000 to 2010. *New Zealand veterinary journal*, *62*(3), 110-116.

Niagro, F. D., Forsthoefel, A. N., Lawther, R. P., Kamalanathan, L., Ritchie, B. W., Latimer, K. S., & Lukert, P. D. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses.*Archives of virology*, *143*(9), 1723-1744.

Nicod, L. (1999). Pulmonary defence mechanisms.*Respiration*, *66*(1), 2-11.

Nicolet, J. (1992). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In Leman, A., (ed) *Diseases of swine*, *7*, 401-408. Iowa State University Press.

Nicolet, J. (1996). Animal mycoplasmoses: a general introduction. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, *15*(4), 1233-1240.

Nietfeld, J. C., & Leslie-Steen, P. (1993). Interstitial nephritis in pigs with adenovirus infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *5*(2), 269-273.

Nodelijk, G., Nielen, M., De Jong, M. C. M., & Verheijden, J. H. M. (2003). A review of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Dutch breeding herds: population dynamics and clinical relevance. *Preventive veterinary medicine*, *60*(1), 37-52.

Nogee, L. M. (2004). Genetic mechanisms of surfactant deficiency. *Neonatology*, *85*(4), 314-318.

Nogueira, R. H. G., Rezende, M., Reis, R., Nascimento, E. F., & Chquiloff, M. A. G. (1980). Alteracoes pulmonares no suino. IV. Diagnosticos micro-biologico e anatomo-patologico da pneumonia enzootica suina (PES) em Minas Gerais. *Arquivos da Escola de Veterinaria da Universidade Federal de Minas Gerais*.

Noyes, E. P., Feeney, D. A., & Pijoan, C. (1990). Comparison of the effect of pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *197*(8), 1025-1029.

Noyes, E. P., Jacobson, L., Mendez, A., & Pijoan, C. (1988). Study of immunological parameters of pigs housed with cold air drafts or fluctuating temperatures. *Proc. 10th IPVS Cong*, 25.

Noyes, E.P., Pijoan, C., Jacobson, L., & Boedicker, J. (1986). Ventilatory environmental for the weaned pig. In: *9th IPVS Congress*, Barcelona, Spain, p. 401.

Núñez, A., McNeilly, F., Perea, A., Sánchez-Cordón, P. J., Huerta, B., Allan, G., & Carrasco, L. (2003). Coinfection by Cryptosporidium parvum and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *50*(5), 255-258.

Oberholzer, M., Dalquen, P., Wyss, M., & Rohr, H. P. (1978). The applicability of the gland/wall ratio (Reid-Index) to clinicopathological correlation studies.*Thorax*, *33*(6), 779-784.

O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E. G., Konoby, C., Allan, G. & Ellis, J. A. (2001). Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *The Canadian Veterinary Journal*, *42*(7), 551.

Ohgami, M., Doerschuk, C.M., English, D., Dodek, P.M., & Hogg, J.C. (1989). Kinetics of radiolabeled neutrophils in swine. *Journal of Applied Physiology*, *66*(4), 1881-1885.

Ohlinger, V. F., Haas, B., & Sallmüller, A. (1992). In vivo and in vitro studies on the immunobiology of PRRS. *American Association of Swine Practitioners Newsletter*, *4*(4), 24.

Ohlinger, V.E., Weiland, E., Haas, B., Visser, N., Ah, R., Mettenleiter, T.C., Weiland, E., Rziha, H.J., Saalmtiller, A., & Straub, O.C. (1991). Der seuchenhafter Spatabort beim Schwein-ein Beitrag zur Atiologie des Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). *Tierarztl Umsch 46,* 703-708.

Okada, M., Asai, T., Futo, S., Mori, Y., Mukai, T., Yazawa, S., Uto, T., Shibata, I., & Sato, S. (2005). Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary microbiology*, *105*(3), 251-259.

Okada, M., Asai, T., Futo, S., Mori, Y., Mukai, T., Yazawa, S., Uto, T., Shibata, I., & Sato, S. (2005). Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*.*Veterinary microbiology*, *105*(3), 251-259.

Oliveira, C. J., Carvalho, L. F., Fernandes, S. A., Tavechio, A. T., & Domingues, F. J. (2005). Prevalence of pigs infected by *Salmonella* Typhimurium at slaughter after an enterocolitis outbreak. *International journal of food microbiology*, *105*(2), 267-271.

Oliveira, S., & Pijoan, C. (2004). *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Veterinary microbiology*, *99*(1), 1-12.

Olsen, C., Karriker, L., Wang, C., Binjawadagi, B., Renukaradhya, G., Kittawornrat, A., Lizano, S., Coetzee, J., Main, R., Meiszberg, A., Panyasing, Y & Zimmerman, J. (2013). Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *The Veterinary Journal*, *198*(1), 158-163.

Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., & Domingo, M. (2004). 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. *Journal of virological methods*, *117*(1), 75-80.

Ondrejková, A., Černek, Ľ., Prokeš, M., Ondrejka, R., Hurníková, Z., & Takáčová, D. (2012). Monitoring of Ascaris suum in slaughter pigs during 2000–2009 in Slovakia. *Helminthologia*, *49*(4), 221-224.

Onuki, A., Abe, K., Togashi, K., Kawashima, K., Taneichi, A., & Tsunemitsu, H. (1999). Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, *61*(10), 1119-1123.

Opriessnig, T., & Langohr, I. (2013). Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Veterinary Pathology Online*, *50*(1), 23-38.

Opriessnig, T., Gimenez-Lirola, L. G., & Halbur, P. G. (2011). Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal Health Research Reviews*, *12*(02), 133-148.

Opriessnig, T., Janke, B. H., & Halbur, P. G. (2006)a. Cardiovascular lesions in pigs naturally or experimentally infected with porcine circovirus type 2. *Journal of comparative pathology*, *134*(1), 105-110.

Opriessnig, T., McKeown, N. E., Harmon, K. L., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2006)b. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clinical and vaccine immunology*, *13*(8), 923-929.

Opriessnig, T., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2007). Porcine circovirus type 2–associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies.*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *19*(6), 591-615.

Opriessnig, T., Patterson, A. R., Madson, D. M., Pal, N., Ramamoorthy, S., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2010). Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Veterinary microbiology*, *142*(3), 177-183.

Opriessnig, T., Thacker, E. L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2004). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2.*Veterinary Pathology Online*, *41*(6), 624-640.

ORDEN de 13 de agosto de 2001 (BOC 117, 5.9.2001), que regula determinados aspectos en materia de libros genealógicos.

ORDEN de 27 de abril de 2007, por la que se reabre el Registro Fundacional del Libro Genealógico de la Raza Porcina Negra Canaria previsto en la Orden de 13 de agosto de 2001, que regula determinados aspectos en materia de libros genealógicos

ORDEN de 27 de abril de 2007, por la que se reabre el Registro Fundacional del Libro Genealógico de la Raza Porcina Negra Canaria previsto en la Orden de 13 de agosto de 2001.

ORDEN de 31 de enero de 2007, que declara la Comarca de Las Palmas indemne a la enfermedad de Aujeszky. (BOC nº 034)

ORDEN de 5 de agosto de 2014, por la que se aprueban las reglamentaciones específicas de los libros genealógicos de las razas autóctonas canarias de las especies caprina, ovina, bovina, porcina y asnal.

ORDEN de 6 de febrero de 2012, por la que se declara la comarca veterinaria de Tenerife indemne de la enfermedad de Aujeszky y se suspende la vacunación del ganado porcino contra la citada enfermedad. (BOC nº 033)

Oslage, U., Dahle, J., Müller, T., Kramer, M., Beier, D., & Liess, B. (1994). [Prevalence of antibodies against the viruses of European swine fever, Aujeszky's disease and" porcine reproductive and respiratory syndrome" in wild boars in the federal states Sachsen-Anhalt and Brandenburg]. *DTW. Deutsche tierarztliche Wochenschrift*, *101*(1), 33-38.

Ostanello, F., Dottori, M., Gusmara, C., Leotti, G., & Sala, V. (2007). Pneumonia Disease Assessment using a Slaughterhouse Lung-Scoring Method. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, *54*(2), 70-75.

Otagiri, Y., Asai, T., Okada, M., Uto, T., Yazawa, S., Hirai, H., Shibata, I., & Sato, S. (2005). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung and nasal swab samples from pigs by nested PCR and culture methods. *Journal of veterinary medical science*, *67*(8), 801-805.

Otake, S., Dee, S. A., Rossow, K. D., Deen, J., Joo, H. S., Molitor, T. W., & Pijoan, C. (2002)a. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). *Journal of Swine Health and Production*, *10*(2), 59-66.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., & Pijoan, C. (2004). Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by individual houseflies (Musca domestica). *Veterinary Record, 154,* 80-85.

Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Farnham, M., & Pijoan, C. (2003). Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire, 67,* 198-203.

Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., & Pijoan, C. (2002)b. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, Aedes vexans (Meigen). *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire 66,* 191-195.

Pabst, R. (1996). The respiratory immune system of pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, *54*(1), 191-195.

Pabst, R., & Binns, R. M. (1994). The immune system of the respiratory tract in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, *43*(1), 151-156.

Pallares, E.J., Halbur, R.G., Opriessnig, T., Sorden, S.D., Villar, D., Janke, B.H., Yaeger, M.J., Larson, D.J., Schwartz, K.J., Yoon, K.J., & Hoffman, L.J. (2002). Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 14,* 515-519.

Palzer, A., Ritzmann, M., Wolf, G., & Heinritzi, K. (2008). Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *The Veterinary Record*, *162*(9), 267-271.

Park, J.S., Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., Lim, J.K., Kim, S.H., & Chae, C. (2005). Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *Journal of comparative pathology*,*132*(2), 139-144.

Pastva, A. M., Wright, J. R., & Williams, K. L. (2007). Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease.*Proceedings of the American Thoracic Society*, *4*(3), 252-257.

Paton, D. J., Brown, I. H., Scott, A. C., Done, S. H., & Edwards, S. (1992). Isolation of a Lelystad virus-like agent from British pigs and scanning electron microscopy of infected macrophages. *Veterinary microbiology*, *33*(1), 195-201.

Paul, P.S., Halbur, P.G., Meng, X.J., & Lum, M.A. (1993). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus associated with nursery pig pneumonia. In: *Proc Annu Meet Livest Conserv Inst*, pp. 105-106.

Paz-Sánchez, Y. (2011). Estudio etiopatogénico del Complejo de Enfermedades Respiratorias Porcinas en una explotación de Gran Canaria: Efecto sobre los parámetros productivos. *Tesina de Grado.* Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Peinado, B., Almela, L., Duchi, N., & Poto, A. (2009). Parámetros de calidad en la canal y en la carne de cerdo Chato Murciano. *Eurocarne*, *173*, 64-80.

Peinado, B., Poto, A., Gil, F., & López, G. (2004). Characteristics of the carcass and meat of the Chato Murciano pig. *Livestock Production Science*, *90*(2), 285-292.

Pensaert, M. (2006). Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus, In: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (eds.) *Diseases of swine. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.*

Pensaert, M.B., Sanchez, R.E., Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Allan, G.M., & Nauwynck, H.J. (2004) Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Veterinary Microbiology, 98,* 175-183.

Pérez de Barradas, J. (1939). Estado actual de las investigaciones prehistóricas sobre Canarias. Memoria acerca de los estudios realizados en 1938 en "El Museo Canario". *Publicaciones de El Museo Canario. Las Palmas de Gran Canaria*.

Peréz, J., Astorga, R., Carrasco, L., Mendez, A., Perea, A., & Sierra, M. A. (1999). Outbreak of salmonellosis in farmed European wild boars (Sus scrofa ferus). *Veterinary record*, *145*(16), 464-465.

Pérez, J., García, P. M., Mozos, E., Bautista, M. J., & Carrasco, L. (2001). Immunohistochemical characterization of hepatic lesions associated with migrating larvae of Ascaris suum in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, *124*(2), 200-206.

Pérez, J., Rodríguez, F., Fernández, A., Delasmulas, J.M., Gomezvillamandos, J.C., & Sierra, M.A. (1994). Detection of african swie fever virus protein VP73 in tissues of experimentally and naturally infected-pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 6,* 360-365.

Pérez-Martín, E., Rovira, A., Calsamiglia, M., Mankertz, A., Rodríguez, F., & Segalés, J. (2007). A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *Journal of virological methods*, *146*(1), 86-95.

Perfumo, C., Petruccelli, M., & Massone, A. (1993). Viral-bacterial interaction on the respiratory tract of swine pathological, immunohistochemical and microbiological studies of field cases. In: *Second Meeting on the Cooperative Research Project in the area of Veterinary Sciences between National University of La Plata and Japan International Cooperation Agency*, pp. 135-137.

Pescador, C. A., Bandarra, P. M., Castro, L. A., Antoniassi, N. A., Ravazzolo, A. P., Sonne, L., Cruz, C.E.F., & Driemeier, D. (2007). Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *27*(10), 425-429.

Pesch, S., Schmidt, U., & Ohlinger, V. (2000). Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). In: *Proceedings of the 16th International Congress on Pigs Veterinary Society*, p. 581.

Petrini, S., Barocci, S., Gavaudan, S., Villa, R., Briscolini, S., Sabbatini, M., Mattozzi, C., Barchiesi, F., Salamida, S., Ferrari, M., Paniccià, M., & Pezzotti, G. (2009). Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) from wild boars in central Italy. *European journal of wildlife research*, *55*(5), 465-469.

Pieters, M., & Pijoan, C. (2006). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in experimentally infected pigs. In: *19th International Pig Veterinary Society, Copenhagen, Denmark*, p. 209.

Piffer, I. A., & Ross, R. F. (1984). Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *American journal of veterinary research*, *45*(3), 478-481.

Piffer, I. A., & Ross, R. F. (1984). Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *American journal of veterinary research*,*45*(3), 478-481.

Piffer, I.A., & Ross, R.F. (1985). Immunofluorescence technique for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine lungs. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, 20,* 877-882.

Pijoan, C. (1994). Serology of *Mycoplasma hyopneumoniae*. In *Allen D. Leman Swine Conference (St. Paul, Minnesota)*, p. 8.

Pijoan, C. (1996). Bacterial respiratory pathogens: What is their impact. In *4th Ann Swine Disease Conference for Swine Practitioners*, pp. 45-47.

Pijoan, C. (1999). Pneumonic pasteurellosis. In Straw, B., DAllaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (eds.), *Diseases of Swine*. *8,* 511-521.Iowa University Press, Iowa.

Pijoan, C. (2005). A controversial view of *Mycoplasma hyopneumoniae* epidemiology. In: *Allen D. Leman Swine Conference, St. Paul, Minnesota,* pp. 114–116.

Pittman, J. S. (2008) Reproductive failure associated with porcine circovirus type 2 in gilts. *Journal of Swine Health and Production, 16,* 144.

Plagemann, P. G., & Moennig, V. (1992). Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv Virus Res*, *41*, 99-192.

Plagemann, P.G.W. (1996). Lactate dehydrogenase-elevating virus and related viruses, In: Fields, B.N., K.D., Howley, P.M. (eds.) *Fields Virology*. 1105-1120. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.

Podgórska, K., & Stadejek, T. (2011). Profiles of seroconversion to porcine circovirus type 2 in herds affected and not affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Acta Veterinaria Hungarica*, *59*(4), 511-520.

Pogranichnyy, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., & Sorden, S.D. (2000). Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral immunology*, *13*(2), 143-153.

Pointon, A. M., Heap, P., & McCloud, P. (1985). Enzootic pneumonia of pigs in South Australia—factors relating to incidence of disease. *Australian veterinary journal*, *62*(3), 98-101.

Pol, J. M. A., Van Dijk, J. E., Wensvoort, G., & Terpstra, C. (1991). Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Veterinary Quarterly*, *13*(3), 137-143.

Pol, J.M.A., van Leengoed, L.A.M.G., Stockhofe, N., Kok, G., & Wensvoort, G. (1997). Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Veterinary Microbiology, 55,* 259-264.

Prickett, J. R., Johnson, J., Murtaugh, M. P., Puvanendiran, S., Wang, C., Zimmerman, J. J., & Opriessnig, T. (2011). Prolonged Detection of PCV2 and Anti-PCV2 Antibody in Oral Fluids Following Experimental Inoculation. *Transboundary and emerging diseases*, *58*(2), 121-127.

Prickett, J. R., Kim, W., Simer, R., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. (2008)b. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *Journal of Swine Health and Production*, *16*(2), 86-91.

Prickett, J., Simer, R., Christopher-Hennings, J., Yoon, K. J., Evans, R. B., & Zimmerman, J. J. (2008)a. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, *20*(2), 156-163.

Prickett, J.R. & Zimmerman, J.J. (2010). The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Animal Health Research Reviews, 11,* 207-216.

Pruitt, K. M., Rahemtulla, B., Rahemtulla, F., & Russell, M. W. (1999). Innate humoral factors, In: Ogra PL, M.J., Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR (Ed.) *Mucosal Immunology. 2nd ed. Academic Press, San Diego*, pp. 65-88.

Puci, A., Clancy, R., & Jackson, G. (1982). Quantitation of T-lymphocyte subsets in human bronchus mucosa. *American Review of Respiratory Disease*, *126*(2), 364-366.

Quesada-Canales, O. (2015). Estudio etiopatogénico del Circovirus porcino tipo 2 asociado a virus y bacterias en una infección natural. *Tesis Doctoral.* Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Quezada, M., Fernández, A., & Martín de las Mulas, J. (1990). Aplicación en Patología veterinaria de las técnicas inmunohistoquímicas II Parte: Técnicas inmunoenzimáticas., In: *Patología Animal*. pp. 5-8.

Quezada, M., Martín de las Mulas, J., Chacon-M., de Lara, F.F., A., Smith, C., & Hebel, P. (1993). Demostración inmunohistoquímica de antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* en pulmones de cerdos con lesiones de neumonía Enzóotica. In I *Congreso Internacional de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP*, p. 124.

Quezada, M., Varas, F., Ruiz, A., Islas, A., Díaz, N., & Lecocq, C. (2004). Detección inmunohistoquímica del antígeno del virus del síndrome respiratorio y reproductivo (vPRRS) en cerdos inoculados. *Archivos de medicina veterinaria*, *36*(2), 183-195.

Quintana, J., Segales, J., Rosell, C., Calsamiglia, M., Rodriguez-Arrioja, G.M., Chianini, F., Folch, J.M., Maldonado, J., Canal, M., Plana-Duran, J., & Domingo, M. (2001). Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Record, 149,* 357-361.

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/.

Rahman, H., Chakraborty, A., Deka, P. J., Narayan, G., & Prager, R. (2001). An outbreak of Salmonella enteritidis infection in pygmy hogs (Sus salvanius).*Tropical animal health and production*, *33*(2), 95-102.

Ramirez, A., Wang, C., Prickett, J. R., Pogranichniy, R., Yoon, K. J., Main, R., Johnson, J. K. , Rademacher, C., Hoogland, M., Hoffmann, P., Kurtz, A., Kurtz, E. & Zimmerman, J. (2012). Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Preventive veterinary medicine*, *104*(3), 292-300.

Ramirez, E., Moreno, V., Diaz, N., Osorio, F., Ruiz, A., Neira, V., & Quezada, M. (2008). Evaluation of the pathogenicity and transmissibility of a Chilean isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Transboundary and emerging diseases*, *55*(2), 115-124.

Ramírez-Mendoza, H., Castillo-Juárez, H., Hernández, J., Correa, P., & Segalés, J. (2009). Retrospective serological survey of porcine circovirus-2 infection in Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *73*(1), 21.

Ramos-Vara, J. A., Duran, O., Render, J. A., & Craft, D. (1997). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. *The Veterinary record*,*141*(18), 479-480.

Real Decreto 360/2009, de 23 de marzo, por el que se establecen las bases del programa coordinado de lucha, control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky

Redondo, E., Masot, A. J., Fernandez, A., & Gazquez, A. (2009). Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of comparative pathology*,*140*(4), 260-270.

Reiner, G., Bronnert, B., Hohloch, C., Fresen, C., Haack, I., Willems, H., & Reinacher, M. (2010). Qualitative and quantitative distribution of PCV2 in wild boars and domestic pigs in Germany. *Veterinary microbiology*, *145*(1), 1-8.

Reiner, G., Fresen, C., Bronnert, S., & Willems, H. (2009). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection in wild boars. *Veterinary Microbiology, 136,* 250-258.

Resendes, A. R., Majó, N., Segalés, J., Mateu, E., Calsamiglia, M., & Domingo, M. (2004). Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2. *Journal of General Virology*, *85*(10), 2837-2844.

Resolución nº 251 de 29-02-2012 de la Dirección General de Ganadería por la que se aprueba el programa de conservación de la raza porcina negra canaria.

Resolución nº 251 de 29-02-2012 de la Dirección General de Ganadería por la que se aprueba el programa de conservación de la raza porcina negra canaria.

Reynolds, H. Y. (1991). Immunologic system in the respiratory tract. *Physiol Rev*, *71*(4), 1117-1133.

Reynolds, H. Y., & Merrill, W. W. (1981). Airway changes in young smokers that may antedate chronic obstructive lung disease. *The Medical clinics of North America*, *65*(3), 667.

Reynolds, S.D., & Malkinson, A.M. (2010). Clara cell: Progenitor for the bronchiolar epithelium. The International *Journal of Biochemistry & Cell Biology, 42,* 1-4.

Riart, G., Sarradell, J., Ambrogi, A., Andrada, M., Pérez, A., Meoni, M., & Bargellini, V. (1996). Prevalencia Estacional de Patologías Respiratorias en Cerdos Criados al Aire Libre. In *IV Congreso Nacional y Pre - Latino de Producción Porcina (Paraná - Argentina).*

Risco, D., Cuesta, J. M., Fernández-Llario, P., Salguero, F. J., Gonçalves, P., García-Jiménez, W. L., Martínez, R., Velarde, R., de Mendoza, M.H., Gómez, L., & de Mendoza, J. H. (2015). Pathological observations of porcine respiratory disease complex (PRDC) in the wild boar (Sus scrofa). *European Journal of Wildlife Research*, *61*(5), 669-679.

Risco, D., Fernández-Llario, P., Cuesta, J. M., García-Jiménez, W. L., Gil, M., Gonçalves, P., Martínez, R., Gómez, L., García, A., & de Mendoza, J. H. (2013). Fatal outbreak of systemic pasteurellosis in a wild boar (Sus scrofa) population from southwest Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *25*(6), 791-794.

Robert, A., Zamorano, M.J., Ginés, R., Henríquez, A.A., Delgado, J.V., & López, J.L. (2000). Origen y estado actual del Cerdo Negro Canario. *Archivos de zootecnia*, *49*(185), 291.

Roca, M., Balasch, M., Segalés, J., Calsamiglia, M., Viaplana, E., Urniza, A., Hattermann, K., Mankertz, A., Plana-Duran, J., Domingo, M. (2004). In vitro and in vivo characterization of an infectious clone of a European strain of porcine circovirus type 2. *Journal of General Virology, 85,* 1259-1266.

Rodríguez, F., Ramírez, G. A., Sarradell, J., Andrada, M., & Lorenzo, H. (2004). Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of comparative pathology*,*130*(4), 306-312.

Rodríguez-Arrioja, G. M., Segalés, J., Balasch, M., Rosell, C., Quintana, J., Folch, J. M., Plana-Duran, J., Mankertz, A. & Domingo, M. (2000). Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Veterinary Record*, *146*(26), 762-764.

Rodríguez-Arrioja, G. M., Segalés, J., Calsamiglia, M., Resendes, A. R., Balasch, M., Plana-Durán, J., Casal, J., & Domingo, M. (2002). Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *American journal of veterinary research*, *63*(3), 354-357.

Rodríguez-Arrioja, G.M., Segalés, J., Rosell, C., Rovira, A., Pujols, J., Plana-Duran, J., & Domingo, M. (2003). Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health 50,* 99-101.

Rodriguez-Cariño, C., & Segalés, J. (2009). Ultrastructural findings in lymph nodes from pigs suffering from naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Pathology Online*, *46*(4), 729-735.

Rodríguez-Prieto, V., Kukielka, D., Martínez-López, B., de las Heras, A. I., Barasona, J. Á., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaíno, J.M. & Vicente, J. (2013). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in wild boar and Iberian pigs in south-central Spain. *European journal of wildlife research*, *59*(6), 859-867.

Rogers, C. S., Abraham, W. M., Brogden, K. A., Engelhardt, J. F., Fisher, J. T., McCray, P. B., McLennan, G., Meyerholz, D.K., Namati, E., Ostedgaard, L., Prather, R., Sabater, J., Stoltz, D., Zabner, J., & Welsh, M. J. (2008). The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *295*(2), 240-263.

Roic, B., Jemersic, L., Terzic, S., Keros, T., Balatinec, J., & Florijancic, T. (2012). Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005-06 and 2009-10.*Journal of wildlife diseases*, *48*(1), 131-137.

Romagosa, A. (2011). Fluidos orales, una nueva herramienta para el diagnóstico, monitoreo y vigilancia epidemiológica en porcino. In: *XIII Jornadas de porcino de la UAB., Barcelona*.

Rosell, C., Segalés, J., & Domingo, M. (2000)a. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology, 37,* 687-692.

Rosell, C., Segalés, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodriguez-Arrioja, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., & Domingo, M. (1999). Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs*. Journal of Comparative Pathology, 120,* 59-78.

Rosell, C., Segalés, J., Ramos-Vara, J.A., Folch, J.M., Rodríguez-Arrioja, G.M., Duran, C.O., Balasch, M., Plana-Duran, J., & Domingo, M. (2000)b. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Record, 146,* 40-43.

Ross, R.F. (1973). Pathogenicity of swine mycoplasmal. *Annals of the New York Academy of Sciences* 225, 347-368.

Ross, R.F. (1999). Mycoplasmal diseases, In Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (*eds.) Diseases of Swine.Iowa State University Press, Ames*, pp. 495-505.

Ross, R.F. (2006). *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. *Animal Health Research Reviews 7,* 13-29.

Ross, R.F., & Whittlestone, P. (1983). Recovery of, identification of, and serological response to porcine mycoplasmas, In Tully, J.G., Razin, S. *(eds.) Methods in Mycoplasmology. Vol II Diagnostic Mycoplasmology. Academic Press, New York*, pp. 115-128.

Rossow, K. D. (1998). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Pathology Online*, *35*(1), 1-20.

Rossow, K. D., Shivers, J. L., Yeske, P. E., Polson, D. D., Rowland, R. R., Lawson, S. R., Murtaugh, M. P. Nelson, E. A. & Collins, J. E. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. *The Veterinary Record*, *144*(16), 444-448.

Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A., & Collins, J.E. (1994)a. Experimental Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus-infection in one-week-old, 4-week-old and 10-week-old pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 6,* 3-12.

Rossow, K.D., Benfield, D.A., Goyal, S.M., Nelson, E.A., ChristopherHennings, J., & Collins, J.E. (1996)a Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs*. Veterinary Pathology 33,* 551-556.

Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopherhennings, J., & Benfield, D.A. (1995). Pathogenesis of Porcine Reproductive and respiratory Syndrome virus-infection in gnotobiotic pigs. *Veterinary Pathology, 32,* 361-373.

Rossow, K.D., Laube, K.L., Goyal, S.M., & Collins, J.E. (1996)b. Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion. *Veterinary Pathology, 33,* 95-99.

Rossow, K.D., Morrison, R.B., Goyal, S.M., Singh, G.S., & Collins, J.E. (1994)b Lymph-node lesions in neonatal pigs congenital y exposed to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 6,* 368-371.

Rovira, A., Balasch, M., Segales, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., & Domingo, M. (2002). Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *Journal of Virology, 76,* 3232-3239.

Ruíz, A., Galina, L., & Pijoan, C. (2002). *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization of pigs sired by different boars. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire, 66,* 79-85.

Ruíz-Fons, F., Vicente, J., Vidal, D., Hofle, U., Villanua, D., Gauss, C., Segales, J., Almeria, S., Montoro, V., & Gortazar, C. (2006). Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology, 65,* 731-743.

Russell M.W., Kiliam, M., & Lamm, M.E. (1999). Biological activities of IgA, In Ogra P.L., Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R. *(eds.) Mucosal Immunology. Academic Press, San Diego*, pp. 225-251.

Rycroft, A.N., & Garside, L.H. (2000). *Actinobacillus* Species and their Role in Animal Disease. *The Veterinary Journal, 159,* 18-36.

Saliki, J., Rodgers, S., & Eskew, G. (1998). Serosurvey of selected viral and bacterial diseases in wild swine from Oklahoma. *Journal of Wildlife Diseases*, *34(4)*, 834-838.

Sánchez, R.E., Meerts, P., Nauwynck, H.J., & Pensaert, M.B. (2003). Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Veterinary Microbiology, 95,* 15-25.

Sánchez, R.E., Meerts, P., Nauwynck, H.J., Ellis, J.A., & Pensaert, M.B. (2004). Characteristics of Porcine Circovirus—2 Replication in Lymphoid Organs of Pigs Inoculated in Late Gestation or Postnatally and Possible Relation to Clinical and Pathological Outcome of Infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 16,* 175-185.

Sánchez, R.E., Nauwynck, H.J., & Pensaert, M. (2001)b. Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium. In *Proceeding of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates (ESVV) Meeting*, p. 122.

Sánchez, R.E., Nauwynck, H.J., McNeilly, F., Allan, G.M., & Pensaert, M.B. (2001)a. Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation. *Veterinary Microbiology 83,* 169-176.

Sánchez-Vizcaíno,J.M.(2006). http://www.sanidadanimal.info/sanidadanimal/es/cursos/inmunologiaporcina/swine-immunology-english.html

Saoulidis, K., Kyriakis, S. C., Kennedy, S., Lekkas, S., Miliotis, C. C., Allan, G., Balkamos, G.C., & Papoutsis, P. A. (2002). First Report of Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome and Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome in Pigs in Greece. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *49*(4), 202-205.

Sarli, G., Ostanello, F., Morandi, F., Fusaro, L., Gnudi, M., Bacci, B., Nigrelli, A., Alborali, L., Dottori, M., Vezzoli, F., Barigazzi, G., Fiorentini, L., Sala, V., Leotti, G., & Joisel, F. (2009). Application of a protocol for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in Italy. *The Veterinary record*, *164*(17), 519-523.

Sarradell, J., Andrada, M., Ramirez, A.S., Fernandez, A., Gomez-Villamandos, J.C., Jover, A., Lorenzo, H., Herraez, P., & Rodriguez, F. (2003). A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae. Veterinary Pathology, 40,* 395-404.

Sarradell, J., Perez, A. M., Andrada, M., Rodriguez, F., Fernandez, A., & Segalés, J. (2002). PMWS in Argentina. *The Veterinary Record*, *150*(10), 323-323.

Sato, K., Shibahara, T., Ishikawa, Y., Kondo, H., Kubo, M., & Kadota, K. (2000). Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, *62*(6), 627-633.

Sattler, T., Sailer, E., Wodak, E., & Schmoll, F. (2012). Serological detection of emerging viral infections in wild boars from different hunting regions of Southern Germany. *Tierärztliche Praxis Großtiere*,*40*(1), 27-32.

Schulze, C., Neumann, G., Grütze, I., Engelhardt, A., Mirle, C., Ehlert, F., & Hlinak, A. (2003). [Case report: Porcine circovirus type 2 infection in an European wild boar (Sus scrofa) in the state of Brandenburg, Germany]. *DTW. Deutsche tierarztliche Wochenschrift*, *110*(10), 426-428.

Schutte, B.C., & McCray, P.B. (2002). β-defensins in lug host defense. *Annual Review of Physiology, 64,* 709-748.

Schwartz, K. (2002). Pathological diagnosis of mycoplasmosis in swine. In: *Swine Mycoplasmal Pneumonia Technical Workshop., Kansas City, MO.*

Schwartz, K.J. (1997). A summary of 1994–1996 Annual Reports of the Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory, Ames, Iowa.

Schwidetzky, I. (1963). *La población prehispánica de las Islas Canarias: investigaciones antropológicas*. Museo arqueológico.

Sedlak, K., Bartova, E., & Machova, J. (2008). Antibodies to Selected Viral Disease Agents in Wild Boars from the Czech Republic. *Journal of Wildlife Diseases, 44,* 777-780.

Seeliger, F., Brügmann, M., Kruger, L., Greiser-Wilke, I., Verspohl, J., Segalés, J., & Baumgärtner, W. (2007). Porcine circovirus type 2-associated cerebellar vasculitis in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pigs. *Veterinary Pathology Online, 44,* 621-634.

Segalés, J. (2002). Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics.*Journal of Swine Health and Production*, *10*(6), 277-281.

Segalés, J. (2006). PCV2/PMWS seminar 12. In *Am Assoc Swine Veterinarians*, 1-7.

Segalés, J. (2012) Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research, 164,* 10-19.

Segalés, J., & Domingo, M. (2002). Postweaning mulstisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Veterinary Quarterly*, *24*(3), 109-124.

Segalés, J., Allan, G. M., & Domingo, M. (2005)a. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*, *6*(02), 119-142.

Segalés, J., Calsamiglia, M., & Domingo, M. (2003). How we diagnose postweaning multisystemic wasting syndrome. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome*.

Segalés, J., Calsamiglia, M., Rosell, C., Soler, M., Maldonado, J., Martín, M., & Domingo, M. (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Veterinary microbiology*, *85*(1), 23-30.

Segalés, J., Domingo, M., Solano, G. I., & Pijoan, C. (1997)a. Immunohistochemical detection of Haemophilus parasuis serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*,*9*(3), 237-243.

Segalés, J., Piella, J., Marco, E., Mateu-de-Antonio, E.M., Espuna, E., & Domingo, M. (1998). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Veterinary Record, 142,* 483-486.

Segalés, J., Rodríguez, M. J., Resendes, A., Balasch, M., Sanz, A. J., Plana-Duran, J., & Venteo, A. (2005)b. Humoral immune response and correlation with viremia in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. In *Proc. Intern. Conf.'Animal Circoviruses and Associated Diseases', Belfast, Ireland, Sept* (pp. 11-13).

Segalés, J., Rosell, C., & Domingo, M. (2004). Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Veterinary microbiology*, *98*(2), 137-149.

Segalés, J., Sitjar, M., Domingo, M., Dee, S., Del Pozo, M., Noval, R., Sacristan, C., De las Heras, A., Ferro, A., & Latimer, K.S. (1997)b. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Veterinary Record, 141,* 600-601.

Segalés, J., Valero, O., Espinal, A., López-Soria, S., Nofrarías, M., Calsamiglia, M., & Sibila, M. (2012). Exploratory study on the influence of climatological parameters on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection dynamics. *International journal of biometeorology*, *56*(6), 1167-1171.

Sheldrake, R. F., Gardner, I. A., Saunders, M. M., & Romalis, L. F. (1990). Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by enzyme-linked immunosorbent assay after experimental and natural infection of pigs. *Australian veterinary journal*,*67*(2), 39-42.

Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., Ono, M., Sasaki, T., Itagaki, M., Nakajima, N., Okabe, Y., & Hidejima, I. (2003). PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *Journal of Veterinary Medical Science, 65,* 405-408.

Shin, J., Torrison, J., Kang, Y. B., & Molitor, T. W. (1996). In situ localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar tissues. In *Proceedings of the 14th International Pig Veterinary Society Congress. Bologne: Italy* (p. 57).

Sibila, M., Calsamiglia, M., Segalés, J., Blanchard, P., Badiella, L., Le Dimna, M., Jestin, A., & Domingo, M. (2004)a. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *American journal of veterinary research*, *65*(1), 88-92.

Sibila, M., Calsamiglia, M., Vidal, D., Badiella, L., Aldaz, Á., & Jensen, J. C. (2004)b. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *68*(1), 12.

Sibila, M., Fort, M., Nofrarias, M., de Rozas, A. P., Galindo-Cardiel, I., Mateu, E., & Segales, J. (2012). Simultaneous porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-inoculation does not potentiate disease in conventional pigs. *Journal of comparative pathology*, *147*(2), 285-295.

Sibila, M., Mentaberre, G., Boadella, M., Huerta, E., Casas-Díaz, E., Vicente, J., Gortazar, C., Marco, I., Lavin, S., & Segalés, J. (2010). Serological, pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in the wild boar. *Veterinary microbiology*, *144*(1), 214-218.

Sibila, M., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Segalés, J., Valero, O., Espinal, A., & Calsamiglia, M. (2007). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Veterinary microbiology*, *122*(1), 97-107.

Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., & Segalés, J. (2009). Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The Veterinary Journal*, *181*(3), 221-231.

Sibille, Y., & Reynolds, H. Y. (1990). Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *American Review of Respiratory Disease*,*141*(2), 471-501.

Simionatto, S., Marchioro, S. B., Maes, D., & Dellagostin, O. A. (2013). *Mycoplasma hyopneumoniae*: from disease to vaccine development. *Veterinary microbiology*, *165*(3), 234-242.

Sirinarumitr, T., Morozov, I., Nawagitgul, P., Sorden, S. D., Harms, P. A., & Paul, P. S. (2000). Utilization of a rate enhancement hybridization buffer system for rapid in situ hybridization for the detection of porcine circovirus in cell culture and in tissues of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome.*Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *12*(6), 562-565.

Sleigh, M. A. (1977). The nature and action of respiratory tract cilia. In *Respiratory defense mechanisms* (Vol. 1, pp. 247-288). Marcel Dekker New York.

Smith, I.M., Hodges, R.T., Betts, A.O., & Hayward, A.H.S. (1973). Experimental infections of gnotobiotic piglets with Pasteurella septica (sero-group A) alone or with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology, 83,* 307-321.

Smith, W. J., Thomson, J. R., & Done, S. (1993). Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record*, *132*(2), 47-47.

Sofia, M., Billinis, C., Psychas, V., Birtsas, P., Sofianidis, G., Leontides, L., Knowles, N., & Spyrou, V. (2008). Detection and genetic characterization of porcine circovirus 2 isolates from the first cases of postweaning multisystemic and wasting syndrome in wild boars in Greece. *Journal of wildlife diseases*, *44*(4), 864-870.

Sorden, S. D. (2000). Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health and production*, *8*(3), 133-136.

Sorensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A. A., Feld, N. C., Friis, N. F., BilleHansen, V., Jensen, N.E., & Pedersen, M. W. (1997). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary Microbiology*, *54*(1), 23-34.

Sorensen, V., Jorsal, S.E., & Mousing, J. (2006). Diseases of the respiratory system. In Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (eds.) *Diseases of swine*. Blackwell Publishing, Ames, pp. 149-177.

Spillane, P., Kennedy, S., Meehan, B., & Allan, G. (1998). Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *The Veterinary record*, *143*(18), 511.

Staats, J.J., Feder, I., Okwumabua, O., & Chengappa, M.M. (1997). *Streptococcus Suis*: Past and Present. *Veterinary Research Communications, 21,* 381-407.

Staebler, S., Sydler, T., Buergi, E., McCullough, K., McNeilly, F., Allan, G., & Pospischil, A. (2005). PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues. *The Veterinary Journal*, *170*(1), 132-134.

Stankevicius, A., Buitkuviene, J., Valanciute, J., Cepulis, R., & Stadejek, T. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in Lithuanian wild boar (Sus scrofa) population. *Proceedings of the EuroPRRS2011, Novi Sad, Serbia*, 54-59.

Stärk, K. D. C. (1999). The role of infectious aerosols in disease transmission in pigs. *The Veterinary Journal*, *158*(3), 164-181.

Stärk, K. D., Keller, H., & Eggenberger, E. (1992). Risk factors for the reinfection of specific pathogen-free pig breeding herds with enzootic pneumonia. *The Veterinary Record*, *131*(23), 532-535.

Stärk, K.D.C., Nicolet, J., & Frey, J. (1998). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology, 64,* 543-548.

Steiner, E., Balmelli, C., Gerber, H., Summerfield, A., & McCullough, K. (2009). Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC veterinary research*,*5*(1), 45.

Stemke, G.W. (1989). A gene probe to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*, the etiological agent of enzootic porcine pneumonia. *Molecular and cellular probes*, *3*(3), 225-232.

Stephenson, G.W., VanAlstine, W. G., Kanitz, C. L., & Keffaber, K. K. (1993). Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without concurrent reproductive failure. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *5*, 432-434.

Stephenson, R.J., Trible, B. R., Wang, Y., Kerrigan, M. A., Goldstein, S. M., & Rowland, R. R. (2015). Multiplex Serology for Common Viral Infections in Feral Pigs (*Sus scrofa*) in Hawaii between 2007 and 2010. *Journal of wildlife diseases*, *51*(1), 239-243.

Stevenson, G.W., (1998). Bacterial pneumonia in swine. In: *Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingam, England*.

Stevenson, G.W., Kiupel, M., Mittal, S.K., Choi, J., Latimer, K.S., & Kanitz, C.L. (2001). Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 13,* 57-62.

Stockhofe-Zurwieden, N., Camarro, J. A., Grosse-Beilage, E., Chavez, J., & Pohlenz, J. (1993). Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *40*(1-10), 261-271.

Strait, E.L., Erickson, B.Z., & Thacker, E.L. (2004). Analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. In *American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting (Des Moines, Iowa)*, p. 95.

Strasser, M., Abiven, P., Kobisch, M., & Nicolet, J. (1992). Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. *Veterinary immunology and immunopathology*, *31*(1), 141-153.

Straw, B. E. (1991). Performance measured in pigs with pneumonia and housed in different environments.*Journal of the American Veterinary Medical Association*, *198*(4), 627-630.

Straw, B. E., Backstrom, L., & Leman, A. D. (1986). Examination of swine at slaughter. II. Findings at slaughter and their significance. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)*.

Straw, B. E., Tuovinen, V. K., & Bigras-Poulin, M. (1989). Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *195*(12), 1702-1706.

Straw, B.E., Henry, S.C., & Fleming, S.A. (1985). Interactions of Management and Animal Performance in a Swine Feedlot. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 186,* 986-988.

Suarez, P., Zardoya, R., Prieto, C., Solana, A., Tabares, E., Bautista, J. M., & Castro, J. M. (1994). Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Archives of virology*, *135*(1-2), 89-99.

Summerfield, A., & McCullough, K. C. (2009). The porcine dendritic cell family. *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(3), 299-309.

Sur, J. H., Cooper, V. L., Galeota, J. A., Hesse, R. A., Doster, A. R., & Osorio, F. A. (1996). In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times postinfection. *Journal of clinical microbiology*, *34*(9), 2280-2286.

Suter, M.M. (1990). Immunopathology. In Slauson, D.O. and Cooper, B.J., (eds) *Mechanism of disease: A textbook of compartive general pathology. 2*(5) 302-376. Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A.

Suveges, T. (2004). Enteric lesions caused by Balantidium coli in weaned pigs infected with circovirus (PCV-2). *Magyar Állatorvosok Lapja*,*126*(11), 664-669.

Swenson, S. L., Hill, H. T., Zimmerman, J. J., Evans, L. E., Wills, R. W., Yoon, K. J., Schwartz K.J., Althouse, G.C., McGinley, M.J., & Brevik, A. K. (1994a). Artificial insemination of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-contaminated semen. *Swine Health Prod*, *2*(6), 19-23.

Swenson, S., Zimmerman, J., Evans, L., Bechtol, D., Hopkins, S., Wills, R., Yoon, K.J., Schwartz, K., Hill, H., & Mc-Ginley, M. (1995). Exposure of gilts to PRRS virus by artificial insemination. In *International Symposium of PRRS*, 42.

Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Evans, L.E., Landgraf, J.G., Wills, R.W., Sanderson, T.P., McGinley, M.J., Brevik, A.K., Ciszewski, D.K., & Frey, M.L. (1994b). Excretion of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus in semen after experimental induced infection in boars. *Journal of the American Veterinary Medical Association, 204,* 1943-1948.

Szeredi, L., & Szentirmai, C. (2008). Proliferative and necrotising pneumonia and severe vascular lesions in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Acta Veterinaria Hungarica*, *56*(1), 101-109.

Szeredi, L., Cságola, A., Dán, Á., & Dencsõ, L. (2015). Vascular Lesions and Pneumonia in a Pig Fetus Infected by Porcine Circovirus Type 2. *Acta Veterinaria Hungárica, 63,* 215-222.

Szeredi, L., Dan, A., Solymosi, N., Csagola, A., & Tuboly, T. (2012). Association of porcine circovirus type 2 with vascular lesions in porcine pneumonia.*Veterinary Pathology Online*, *49*(2), 264-270.

Terpstra, C., Wensvoort, G., & Pol, J. M. A. (1991)a. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad vims: Koch's postulates fulfilled. *Veterinary Quarterly*, *13*(3), 131-136.

Terpstra, C., Wensvoort, G., & Ter Laak, E. A. (1991)b. The "new" pig disease: laboratory investigations. In *The new pig disease porcine respiration and reproductive syndrome: a report on the seminar/workshop held in Brussels on 29–30 April 1991 and organized by the European Commission (Directorate General for Agriculture)* (pp. 36-45).

Thacker, B. (2002). *M. hyopneumoniae-associated* respiratory disease on the farm. In: *Swine Mycoplasmal Pneumonia Workshop, Kansas city*, MO.

Thacker, B., & Thacker, E. (2000). The PRDC battle continues. *Pig Progress*, 16-18.

Thacker, E. L. (2001b). Immunology of the porcine respiratory disease complex. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, *17*(3), 551-565.

Thacker, E. L. (2004). Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Animal Health Research Reviews*,*5*(02), 317-320.

Thacker, E., & Minion, F. (2012). Micoplasmal Diseases. In Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K. & Stevenson, G. (eds), *Diseases of Swine,* 779-788. Wiley & Sons Inc.

Thacker, E.L. & Minion, F. (2012). Micoplasmal Diseases. In Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., & Stevenson, G. (eds) *Diseases of Swine,* 779-788. Wiley & Sons Inc.

Thacker, E.L. (2001a). Porcine respiratory disease complex-what is it and why does it remain a problem?. *Pig Journal*, *48*, 66-70.

Thacker, E.L. (2002). Porcine Respiratory Disease Complex. In: *The 15th Congress of FAVA-OIE Joint Symposium on Emerging Diseases, Bangkok, Thailand.*

Thacker, E.L. (2004). Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Animal Health Research Reviews*, *5*(02), 317-320.

Thacker, E.L. (2006), Mycoplasmal Disease, In: Straw, B.E., Zimmermann, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (eds.) *Diseases of Swine. State University Press, Ames, Iowa, State University Press, Ames*, pp. 701–717.

Thacker, E.L., Halbur, P. G., Ross, R. F., Thanawongnuwech, R., & Thacker, B. J. (1999). *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(3), 620-627.

Thacker, E.L., Strait, E., Kesl, L. (2010). Comparison of mycoplasmal lung lesion scoring methods. In *Proceeding of the International Pig Veterinary Association*, 144.

Thacker, E.L., Thacker, B. J., & Janke, B. H. (2001). Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *Journal of clinical microbiology*, *39*(7), 2525-2530.

Thacker, E.L., Thacker, B. J., Young, T. F., & Halbur, P. G. (2000). Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vaccine*, *18*(13), 1244-1252.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P. G., & Thacker, E. L. (2000). The role of pulmonary intravascular macrophages in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Animal Health Research Reviews*, *1*(02), 95-102.

Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P., & Thacker, E. L. (2004). Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, *11*(5), 901-908.

Thanawongnuwech, R., Thacker, E. L., & Halbur, P. G. (1997). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): in vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). *Veterinary immunology and immunopathology*, *59*(3), 323-335.

Thanawongnuwech, R., Thacker, E. L., & Halbur, P. G. (1997). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)(isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): in vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). *Veterinary immunology and immunopathology*, *59*(3), 323-335.

Thanawongnuwech, R., Young, T. F., Thacker, B. J., & Thacker, E. L. (2001). Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-infection model.*Veterinary immunology and immunopathology*, *79*(1), 115-127.

Thibault, S., Drolet, R., Germain, M. C., D'allaire, S., Larochelle, R., & Magar, R. (1998). Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Veterinary Pathology Online*, *35*(2), 108-116.

Thompson, K. (2007). Bones and joints. *Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals*, *1*, 1-184.

Thomson, J. R., Higgins, R. J., Smith, W. J., & Done, S. H. (2002). Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. Clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993–1998). *Journal of Veterinary Medicine Series A*, *49*(8), 430-437.

Thomson, J. R., MacIntyre, N., Henderson, L. E., & Meikle, C. S. (2001). Detection of Pasteurella multocida in pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *The Veterinary Record*,*149*(14), 412-417.

Ticó, G., Segalés, J., & Martinez, J., (2013). The blurred border between porcine circovirus type 2-systemic disease and porcine respiratory disease complex. *Veterinary Microbiology, 163,* 242-247.

Tillon, J. P., & Kobisch, M. (1987). Données épidémiologiques sélectionnées pour aborder la prévention des maladies respiratoires du porc. *Rec Med Vet*, *163*(4), 381-93.

Tischer, I., Mields, W., Wolff, D., Vagt, M., & Griem, W. (1986). Studies on Epidemiology and Pathogenicity of Porcine Circovirus. *Archives of Virology, 91,* 271-276.

Tischer, I., Rasch, R., & Tochtermann, G. (1974). Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines.*Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, *226*(2), 153-167.

Tizard, I. R. (2000). *Inmunología Veterinaria: 6 ta ed. WB Saunders Company. Philadelphia (Pennsylvania), USA*. ISBN 0-7216-8218-9.

Togashi, K., Mawatari, T., Mitobe, S., & Moriya, S. (2011). Reproductive losses associated with porcine circovirus type 2 in a Japanese herd of seronegative sows. *Journal of Veterinary Medical Science 73,* 941-944.

Tomás, A., Fernandes, L. T., Valero, O., & Segalés, J. (2008). A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary microbiology*, *132*(3), 260-273.

Torrison, J. (2012). Optimizing Diagnostic Value and Sample Collection. In Zimmerman, J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., & Stevenson, G. (eds.) *Diseases of Swine, 10*(6), 67-76. John Wiley & Sons, Inc.

Touloudi, A., Valiakos, G., Athanasiou, L. V., Birtsas, P., Giannakopoulos, A., Papaspyropoulos, K., Kalaitzis, C., Sokos, C., Tsokana, C. N., Spyrou, V., Petrovska, L & Billinis, C. (2015). A serosurvey for selected pathogens in Greek European wild boar. *Veterinary Record Open*, *2*(2).

Travis, S.M., Conway, B.A.D., Zabner, J., Smith, J.J., Anderson, N.N., Singh, P.K., Greenberg, E., & Welsh, M.J. (1999). Activity of Abundant Antimicrobials of the Human Airway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 20,* 872-879.

Trujano, M., Iglesias, G., Segalés, J., & Palacios, J. M. (2001). PCV-2 from emaciated pigs in Mexico.*The Veterinary record*, *148*(25), 792.

Turcitu, M.A., Wellenberg, G.J., Barboi, G., Codreanu, M.D., Vuta, V.B., Nicolae, S., Barbuceanu, F., Coste, H., & Cioranu, R. (2011). Genetic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the Romanian wild boar population. *Research in veterinary science*, *91*(3), e103-e106.

Turner, M. J., Medley, G. F., Woodbine, K. A., Slevin, J. A., & Green, L. E. (2009). The relationship between porcine circovirus 2 antigen score and antibody titre and histology of lymph nodes in 375 euthanased sick and healthy pigs from 113 British pig farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Preventive veterinary medicine*, *88*(3), 213-219.

Underdown, B.J., & Schiff, J.M. (1986). Immunoglobulin A: Strategic Defense Initiative at the Mucosal Surface. *Annual Review of Immunology, 4,* 389-417.

Vahle, J. L., Haynes, J. S., & Andrews, J. J. (1995). Experimental reproduction of Haemophilus parasuis infection in swine: clinical, bacteriologic, and morphologic findings. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *7*(4), 476-480.

Van Alstine, W. G., Popielarczyk, M., & Albregts, S. R. (2002). Effect of formalin fixation on the immunohistochemical detection of PRRS virus antigen in experimentally and naturally infected pigs.*Journal of veterinary diagnostic investigation*, *14*(6), 504-507.

Van Alstine, W. G., Stevenson, G. W., & Kanitz, C. L. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Veterinary microbiology*, *49*(3), 297-303.

Van Alstine, W.G. (2012). Respiratory System. In Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K. & Stevenson, G. (eds.) *Diseases of Swine, 10,*(21),461-486. Wiley & Sons Inc.

Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., (1996), Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Veterinary Microbiology* 48, 325-335.

Van Woensel, P., Van Der Wouw, J., & Visser, N. (1994). Detection of porcine reproductive respiratory syndrome virus by the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*, *47*(3), 273-278.

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

Vengust, G., Valencak, Z., & Bidovec, A. (2006). A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*,*53*(1), 24-27.

Vercruysse, J., Van Hoof, D., & DeBie, S. (1997). Studies on the prevalence of white spots of the liver in pigs in Belgium and relationship to management practices and anthelmintic treatment. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 66,*28-30.

Vicca, J., Maes, D., Thermote, L., Peeters, J., Haesebrouck, F., & Kruif, A. (2002). Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* Infections in Belgian Farrow-to-Finish Pig Herds with Diverging Disease-Course. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*,*49*(7), 349-353.

Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A., & Haesebrouck, F. (2003). Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Veterinary Microbiology 97,* 177-190.

Vicente, J., León-Vizcaíno, L., Gortázar, C., Cubero, M. J., González, M., & Martín-Atance, P. (2002). Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain.*Journal of Wildlife Diseases*, *38*(3), 649-652.

Vicente, J., Segalés, J., Höfle, U., Balasch, M., Plana-Durán, J., Domingo, M., & Gortázar, C. (2004). Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (Sus scrofa). *Veterinary research*, *35*(2), 243-253.

Vico, J.P., & Mainar-Jaime, R.C. (2011). The use of meat juice or blood serum for the diagnosis of Salmonella infection in pigs and its possible implications on Salmonella control programs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 23,* 528-531.

Vigre, H., Enøe, C., Bøtner, A., Jorsal, S.E., Bækbo, P., & Okholm, E., (2006). Association between PMWS and PRRSV. In: *The 19th International Pig Veterinary Congress, Copenhagen*, p. 174.

Vigre, H., Ersbøll, A. K., & Sørensen, V. (2003). Decay of acquired colostral antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *50*(9), 430-435.

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

Vincent, I. E., Carrasco, C. P., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G. M., Summerfield, A., & McCullough, K. C. (2005). Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology*, *115*(3), 388-398.

Vincent, I. E., Carrasco, C. P., Herrmann, B., Meehan, B. M., Allan, G. M., Summerfield, A., & McCullough, K. C. (2003). Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *Journal of virology*, *77*(24), 13288-13300.

Vlaminck, J., Düsseldorf, S., Heres, L., & Geldhof, P. (2015). Serological examination of fattening pigs reveals associations between Ascaris suum, lung pathogens and technical performance parameters.*Veterinary parasitology*.

Vlaminck, J., Düsseldorf, S., Heres, L., & Geldhof, P. (2015). Serological examination of fattening pigs reveals associations between Ascaris suum, lung pathogens and technical performance parameters.*Veterinary parasitology*.

Voicu, I. L., Silim, A., Morin, M., & Elazhary, M. A. (1994). Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes.*Veterinary record*, *134*(16), 422-423.

Volf, J., Stepanova, H., Matiasovic, J., Kyrova, K., Sisak, F., Havlickova, H., Leva, L., Faldyna, M., Rychlik, I., & Rychlik, I. (2012). Salmonella enterica serovar Typhimurium and Enteritidis infection of pigs and cytokine signalling in palatine tonsils. *Veterinary microbiology*, *156*(1), 127-135.

Vranckx, K., Maes, D., Sacristán, R. D. P., Pasmans, F., & Haesebrouck, F. (2012). A longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds.*Veterinary microbiology*, *156*(3), 315-321.

Vyt, P., Labar, G., Bos, M., Nauwynck, H., Roels, S., Miry, C., Pensaert, M., & Ducatelle, R. (2000). The ''post-weaning multisystemic wasting syndrome'' in Belgium. *Flemish Vet J. 69,* 435–440.

Wagner, J., Kneucker, A., Liebler-Tenorio, E., Fachinger, V., Glaser, M., Pesch, S., Murtaugh, M.P., & Reinhold, P. (2011). Respiratory function and pulmonary lesions in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Veterinary Journal*,*187*(3), 310-319.

Wagstrom, E. A., Chang, C. C., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2001). Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. *American journal of veterinary research*, *62*(12), 1876-1880.

Walker, I. W., Konoby, C. A., Jewhurst, V. A., McNair, I., McNeilly, F., Meehan, B. M., Cottrell, T.S., Ellis, J.A., & Allan, G. M. (2000). Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *12*(5), 400-405.

Wallgren, P., Beskow, P., Fellström, C., & Renström, L. H. M. (1994). Porcine lung lesions at slaughter and their correlation to the incidence of infections by *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* during the rearing period. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*,*41*(1-10), 441-452.

Wallgren, P., Hasslung, F., Bergström, G., Linder, A., Belak, K., af Segerstad, C. H., Stampe, M., Molander, B., Kallay, T.B., & Robertsson, J. Å. (2004). Postweaning multisystemic wasting syndrome-PMWS. The first year with the disease in Sweden. *Veterinary quarterly*, *26*(4), 170-187.

Weibel, E. R. (1973). Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiolical Reviews*, *53*(2), 419-495.

Wellenberg, G., Stockhofe-Zurwieden, N., De Jong, M., Boersma, W., & Elbers, A. (2004). Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Veterinary Microbiology, 99,* 203-214.

Wellenberg, G.J., Pesch, S., Berndsen, F.W., Steverink, P.J.G.M., Hunneman, W., van der Vorst, T.J.K., Peperkamp, N.H.M.T., Ohlinger, V.F., Schippers, R., & de Jong, M.F. (2000). Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, *22*(3), 167-172.

Wellenberg, G.J., Stockhofe-Zurwieden, N., Boersma, W., Elbers, A., & Jong, M.F. (2003). Infections of European and American-type porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in PMWS affected pigs: A case-control study. In: *4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases., Rome,* p. 71–72.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.A., Terlaak, E.A., Bloemraad, M., Dekluyver, E.P., Kragten, C., Vanbuiten, L., Denbesten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, J.M., Moonen, P., Zetstra, T., Deboer, E.A., Tibben, H.J., Dejong, M.F., Vantveld, P., Groenland, G.J.R., Vangennep, J.A., Voets, M.T., Verheijden, J.H.M., & Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in The Netherlands - The isolatin of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly, 13,* 121-130.

West, K. H., Bystrom, J. M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G. M., Haines, M., Clark, E.G., Krakowka S. & Ellis, J. A. (1999). Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*,*11*(6), 530-532.

Whary, M.T., Zarkower, A., Confer, F.L., & Ferguson, F.G. (1995). Age-Related Differences in Subset Composition and Activation Responses of Intestinal Intraepithelial and Mesenteric Lymph Node Lymphocytes from Neonatal Swine. *Cellular Immunology, 163,* 215-221.

White, M. (2011). Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC): Part 6: Ancillary infections and parasites. *Livestock*, *16*(7), 39-41.

Wills, R. W., Gray, J. T., Fedorka-Cray, P. J., Yoon, K. J., Ladely, S., & Zimmerman, J. J. (2000). Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. *Veterinary microbiology*, *71*(3), 177-192.

Wills, R. W., Zimmerman, J. J., Yoon, K. J., Swenson, S. L., Hoffman, L. J., McGinley, M. J., Hill, H.T., & Platt, K. B. (1997b). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion.*Veterinary microbiology*, *57*(1), 69-81.

Wills, R. W., Zimmerman, J. J., Yoon, K. J., Swenson, S. L., McGinley, M. J., Hill, H. T., Platt, K.B., Christopher-Hennings, J. & Nelson, E. A. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection.*Veterinary microbiology*, *55*(1), 231-240.

Woolley, L. K., Fell, S., Gonsalves, J. R., Walker, M. J., Djordjevic, S. P., Jenkins, C., & Eamens, G. J. (2012). Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates.*Veterinary microbiology*, *161*(1), 186-195.

Wu, N., Abril, C., Hinicacute, V., Brodard, I., Thür, B., Fattebert, J., Hüssy, D., & Ryser-Degiorgis, M. P. (2011). Free-ranging wild boar: a disease threat to domestic pigs in Switzerland?. *Journal of wildlife diseases*, *47*(4), 868-879.

Yaeger, M. J. (2002). The diagnostic sensitivity of immunohistochemistry for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lung of vaccinated and unvaccinated swine. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, *14*(1), 15-19.

Yaeger, M., N. Funk & L. Hoffman (2002) A Survey of Agents Associated with Neonatal Diarrhea in Iowa Swine Including Clostridium Difficile and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 14, 281-287.

Yagihashi, T., Nunoya, T., Mitui, T., & Tajima, M. (1984). Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of Haemophilus pleuropneumoniae pneumonia in pigs. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, *46*(5), 705-713.

Yang, H., & Parkhouse, R. M. E. (1996). Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology*, *89*(1), 76-83.

Yazawa, S., Okada, M., Ono, M., Fujii, S., Okuda, Y., Shibata, I., & Kida, H., (2004), Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus (A/Sw/Hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae. Veterinary Microbiology, 98,* 221-228.

Yoon, I. J., Joo, H., Christianson, W. T., Morrison, R. B., & Dial, G. D. (1993). Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Swine Health Prod*, *1*(4), 5-8.

Yoon, K.J., Edington, N., (2006), Porcine Cytomegalovirus, In: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.) *Diseases of swine.* Blackwell Publishing, Ames, Iowa.

Young, T. F., Ross, R. F., & Drisko, J. (1983). Prevalence of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in Iowa swine. *American journal of veterinary research*, *44*(10), 1946-1948.

Young, T. F., Thacker, E. L., Erickson, B. Z., & Ross, R. F. (2000). A tissue culture system to study respiratory ciliary epithelial adherence of selected swine mycoplasmas. *Veterinary microbiology*, *71*(3), 269-279.

Zeman, D. (1996) Concurrent respiratory infections in 221 cases of PRRS virus pneumonia: 1992–1994. *Swine Health and Production, 4,* 143-145.

Zeman, D., Neiger, R., Yaeger, M., Nelson, E., Benfield, D., Leslie-Steen, P., Thomson, J., Miskimins, D., Daly, R., & Minehart, M. (1993). Laboratory investigation of PRRS virus infection in three swine herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *5*(4), 522-528.

Zhang, G., Ross, C. R., & Blecha, F. (2000). Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Veterinary research*,*31*(3), 277-296.

Zhang, H., Lunney, J. K., Baker, R. B., & Opriessnig, T. (2011). Cytokine and chemokine mRNA expression profiles in tracheobronchial lymph nodes from pigs singularly infected or coinfected with porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHYO). *Veterinary immunology and immunopathology*, *140*(1), 152-158.

Zhang, Q., Young, T. F., & Ross, R. F. (1995). Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infection and immunity*,*63*(3), 1013-1019.

Zhao, C. Z., Fang, X. C., Wang, D., & Wang, X. D. (2010). Involvement of type II pneumocytes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine*, *104*(10), 1391-1395.

Zielinski, G. C., & Ross, R. F. (1992). Morphologic features and hydrophobicity of the cell surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *American journal of veterinary research*, *53*(7), 1119-1124.

Zielinski, G. C., & Ross, R. F. (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *American journal of veterinary research*, *54*(8), 1262-1269.

Zimmerman, J., Benfield, D. A., Murtaugh, M. P., Osorio, F., Stevenson G. W. , & Torremorell, M. (2006). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). In*,* Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire S., & Taylor D. J. (eds.) *Diseases of swine*, 387-418. Blackwell Publishing Professional. Ames, Iowa, USA.

Zimmerman, J., Benfield, D., Dee, S., Murtagh, M.P., Stadejek, T., Stevenson, G. & Torremorell, M. (2012). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). In Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K. & Stevenson, G. (eds.) *Diseases of Swine,* 461-486. Wiley & Sons Inc.

Zimmermann, B. J., & Ross, R. F. (1982). Antibody response of swine experimentally infected with Mycoplasma hyosynoviae. *Veterinary microbiology*,*7*(2), 135-146.

Zlotowski, P., Corrêa, A. M., Barcellos, D. E., Cruz, C. E., Asanome, W., Barry, A. F., Alfieri, A., & Driemeier, D. (2008). Intestinal lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *28*(6), 313-318.

Zupancić, Z., Jukić, B., Lojkić, M., Cac, Z., Jemeršić, L., & Starešina, V. (2002). Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *49*(5), 253-256.

Zupancić, Z., Jukić, B., Lojkić, M., Cac, Z., Jemeršić, L., & Starešina, V. (2002). Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *49*(5), 253-256.