

---

---

## LA INTERACCIÓN DEL VIRUS DE PRRS Y *Mycoplasma hyopneumoniae* - SU POSIBLE PAPEL EN EL COMPLEJO RESPIRATORIO PORCINO

Eileen L. Thacker, DVM, PhD, Diplomate ACVM

College of Veterinary Medicine, Iowa State University

La enfermedad respiratoria continua siendo uno de los principales problemas económicos para los productores de cerdos a nivel mundial. En años recientes, la enfermedad respiratoria a plagado las operaciones porcinas a tal grado, que se han tenido que instituir estrategias intensivas de reducción de enfermedades tales como el destete segregado, la producción en sitios múltiples y el destete precoz. Este cuadro clínico se ha identificado como el "complejo respiratorio porcino" (CRP). El CRP se caracteriza por crecimiento lento, disminución de la eficiencia alimenticia, anorexia, fiebre, tos y disnea en cerdos de crecimiento-finalización alrededor de 18 a 20 semanas de edad<sup>1</sup>. Estimamos que el CRP afecta 10 millones de animales anualmente en los E.U.A., con un impacto económico de 40 millones de dólares en el mismo período. Los laboratorios de diagnóstico han aislado, a partir de casos de CRP, varios patógenos entre los que se incluyen el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VPRRS), *Mycoplasma hyopneumoniae*, virus de influenza porcina (VIP), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* y virus de la Enfermedad de Aujeszky<sup>2</sup>. De estos patógenos, el VPRRS, *Mycoplasma hyopneumoniae* y el VIP son los más frecuentemente aislados. La mayoría de los casos severos de CRP examinados recientemente en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad Estatal de Iowa (LDV-UEI) fueron positivos a VPRRS y tuvieron lesiones microscópicas típicas de infección por *M. hyopneumoniae*. El CRP parece haber incrementado en severidad no obstante el uso difundido de vacunas comerciales contra el VPRRS y *M. hyopneumoniae*.

*M. hyopneumoniae* ha sido reconocido como el agente causal de la neumonía enzoótica, una neumonía ligera y crónica comúnmente complicada por infecciones bacterianas oportunistas<sup>3</sup>. *M. hyopneumoniae* por sí solo produce una neumonía ligera y crónica caracterizada por tos esporádica no productiva, con poco o ningún efecto sobre la capacidad de crecimiento. Las lesiones típicas de micoplasma consisten en áreas bien demarcadas de consolidación rojo obscura (aguda) a grisácea (crónica) en las regiones craneoventrales del pulmón. La observación microscópica revela bronconeumonía con alveolitis supurativa e histiocítica, cúmulo linfohistiocítico peribronquiolar y perivascular y formación consistente de nódulos con hiperplasia del tejido linfoide asociado a bronquios (BALT).

La patogenia de la neumonía micoplásmica es compleja y no sólo depende del daño causado directamente por el microorganismo, sino también de las células del sistema inmune del hospedador. Inicialmente, *M. hyopneumoniae* se adhiere a los cilios del epitelio traqueal y bronquial, lo que resulta en aglutinación y pérdida excesiva de cilios<sup>4</sup>. Se piensa que la pérdida de la función mucociliar es una de las principales razones de la incrementada incidencia de infecciones secundarias asociadas con la infección de *M. hyopneumoniae*. Además, los cambios inmunopatológicos son un componente importante en muchas enfermedades respiratorias por micoplasma, aunque se conoce poco acerca de los mecanismos fundamentales de las respuestas inmune e inflamatoria. *M. hyopneumoniae* ha mostrado tener efecto tanto inmunosupresor como estimulador de linfocitos<sup>5,6</sup>. Adicionalmente, Tajima y col. encontraron que las lesiones neumónicas fueron menos severas en cerdos timectomizados, sugiriendo que los mecanismos inmunes mediados por células son importantes en el desarrollo de lesiones neumónicas<sup>7</sup>. La neumonía enzoótica ocurre cuando se combina *M. hyopneumoniae* con bacterias oportunistas tales como *P. multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* o *Actinomyces pyogenes*. Estas infecciones mixtas resultan en desmedro, reducción de la ganancia de peso (16-30%) y aumento en la conversión alimenticia (14-20%)<sup>8</sup>.

El virus de PRRS, un *Arterivirus*, se ha convertido en uno de los patógenos económicamente más importantes en la industria porcina desde que apareció por primera vez en 1987<sup>9</sup>. Se ha demostrado que la infección de los macrófagos alveolares con el VPRRS induce lisis celular *in vitro*<sup>10</sup> y los macrófagos necróticos en los espacios alveolares son una lesión microscópica característica de pulmones infectados con VPRRS<sup>11</sup>. Se cree que la lisis y disminución de la función de los macrófagos

---

alveolares explican la reducción de la capacidad del tracto respiratorio del cerdo para defenderse de otros patógenos respiratorios, especialmente bacterias. Consecuentemente, muchos investigadores han sugerido que el VPRRS es el patógeno primario que inicia el CRP y las bacterias sirven como invasores secundarios u oportunistas en la patogenia del CRP. Esta hipótesis concuerda con el paradigma comúnmente conocido de que los virus predisponen al hospedador a infecciones bacterianas secundarias. En contraste, un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio demostró que la infección con *M. hyopneumoniae* incrementa la severidad y duración de la neumonía inducida por el VPRRS<sup>12</sup>. Más importante, los cerdos infectados con ambos patógenos, con un mínimo de lesiones neumónicas inducidas por *M. hyopneumoniae*, exhibieron neumonía inducida por VPRRS que persistió por un período significativamente mayor que en cerdos libres de *M. hyopneumoniae*, sugiriendo que hay un efecto sinérgico entre los dos patógenos. Los mecanismos por los cuales *M. hyopneumoniae* exacerba la neumonía por VPRRS son desconocidos.

**DISEÑO EXPERIMENTAL** En nuestro desafío experimental, 140 cerdos libres de VPRRS y micoplasma fueron divididos en 7 grupos de tratamiento. Los cerdos fueron inoculados con *M. hyopneumoniae* 21 días antes de, concomitantemente con y 10 días después de la inoculación con VPRRS. Los cerdos tenían 6 semanas de edad los 0 días post inoculación (DPI). Los tiempos de inoculación fueron seleccionados para asegurar que habría inducción de neumonía significativa para cada patógeno. Se utilizaron intervalos de necropsia a los 3, 10 y 28 días para establecer lesiones agudas (3 DPI), máximo de lesiones por VPRRS (10 DPI) y máximo de lesiones por *M. hyopneumoniae* (28 DPI).

Los cerdos fueron evaluados durante los primeros 14 días después de la inoculación con VPRRS para determinar enfermedad respiratoria clínica atribuible al VPRRS (Tabla 1). También se establecieron las temperaturas rectales en ese tiempo. Todos los cerdos se evaluaron diariamente para condición general de salud y tos, el cual es el único signo específico para *M. hyopneumoniae*. A la necropsia, los pulmones se examinaron para lesiones macroscópicas y microscópicas y se colectó fluido de lavado broncoalveolar para aislamiento viral. Se colectaron muestras de pulmón para aislamiento y titulación de *M. hyopneumoniae* y virus.

**RESULTADOS.** Todos los grupos inoculados con VPRRS mostraron signos de enfermedad respiratoria compatible con neumonía inducida por VPRRS. Estos signos incluyeron dificultad para respirar e incremento de la frecuencia respiratoria. Se observó tos en todos los grupos inoculados con *M. hyopneumoniae*, comenzando entre 10-14 DPI, pero no en los cerdos infectados sólo con VPRRS o en los cerdos control. Los cerdos que recibieron *M. hyopneumoniae* 21 días antes de la inoculación con VPRRS, desarrollaron significativamente más enfermedad respiratoria severa y fiebres altas dentro de los primeros 3 DPI que aquellos cerdos que recibieron VPRRS y *M. hyopneumoniae* conjuntamente. El análisis de los registros de la enfermedad respiratoria indicaron que los cerdos en los grupos infectados con *M. hyopneumoniae* y VPRRS tuvieron enfermedad respiratoria clínica más severa en comparación con los grupos infectados sólo con un microorganismo.

El porcentaje de tejido pulmonar con neumonía visible, ya sea inducida por VPRRS o por *M. hyopneumoniae*, se muestra en la Tabla 2. La neumonía compatible con VPRRS apareció en los cerdos inoculados con el virus a los 3 DPI. Para los 10 DPI, ya fue visible la neumonía micoplásmica en los cerdos infectados con ambos patógenos, aunque los niveles en cerdos infectados sólo con *M. hyopneumoniae*, inoculados 31 días antes, fue mínima.

A los 28 DPI, todos los grupos infectados con ambos patógenos aún exhibieron lesiones compatibles con neumonía inducida por VPRRS. En contraste, la neumonía inducida por VPRRS se observó en sólo 2 de los 8 cerdos en el grupo inoculado solamente con VPRRS. De manera interesante, mientras sólo 2 de los cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae* 21 días antes que VPRRS tuvieron lesiones macroscópicas obvias compatibles con neumonía micoplásmica, todos los cerdos en el grupo aún tuvieron lesiones neumónicas compatibles con VPRRS a los 28 DPI.

Las evaluaciones histopatológicas están presentadas en la Tabla 3. Neumonía intersticial compatible con neumonía inducida por VPRRS estuvo presente en todos los cerdos infectados con VPRRS a los

3 DPI. Esta neumonía estuvo caracterizada por hipertrofia e hiperplasia de neumocitos Tipo 2, engrosamiento septal con monocitos y exudado alveolar consistente de macrófagos, tejido necrótico y células multinucleadas. La hiperplasia peribronquiolar de tejido linfoide inducida por *M. hyopneumoniae* no se observó a los 3 DPI. A los 10 DPI, lesiones microscópicas compatibles con *M. hyopneumoniae* fueron más severas en los grupos infectados con VPRRS y *M. hyopneumoniae* en comparación con el grupo infectado únicamente con *M. hyopneumoniae*.

Los cerdos infectados con VPRRS antes o simultáneamente con la inoculación de *M. hyopneumoniae* tuvieron un incremento significativo en la neumonía intersticial inducida por VPRRS a los 28 DPI, en comparación con el grupo que solo recibió VPRRS. Lesiones microscópicas compatibles con *M. hyopneumoniae* fueron más severas en los grupos infectados con ambos patógenos en comparación con los cerdos inoculados solamente con *M. hyopneumoniae*.

**CONCLUSIÓN.** Basados en este estudio, concluimos que *M. hyopneumoniae* puede actuar como un cofactor, potencializando la neumonía inducida por el VPRRS. La potencialización del VPRRS por *M. hyopneumoniae* fue documentada clínicamente, macroscópicamente y microscópicamente. El incremento en la severidad y duración de la neumonía inducida por el VPRRS se observó en todos los cerdos infectados con ambos patógenos, comparado con los cerdos infectados sólo con VPRRS. *M. hyopneumoniae* potencializó la neumonía viral independientemente de cuándo ocurrió la infección viral. Sorpresivamente, aún cuando *M. hyopneumoniae* no indujo lesiones macroscópicas típicamente observadas en nuestro modelo de desafío, la neumonía inducida por VPRRS fue aún potencializada. Los cerdos que recibieron *M. hyopneumoniae* 21 días antes a la inoculación con VPRRS tuvieron neumonía micoplásmica no observable aún, tuvieron lesiones inducidas por VPRRS que persistieron por 4 semanas después de la inoculación con VPRRS, mientras que las lesiones inducidas por VPRRS típicamente se resolvieron en el transcurso de 4 semanas en los cerdos que recibieron sólo VPRRS.

La relación temporal entre infecciones con *M. hyopneumoniae* y VPRRS no pareció influenciar la severidad de la neumonía inducida por VPRRS, sugiriendo que la infección con *M. hyopneumoniae* en cualquiera de los tiempos utilizados en este estudio en relación a la infección con VPRRS, resultó en la prolongación y mayor severidad de la neumonía inducida por VPRRS. Además, aún con la ligera infección con *M. hyopneumoniae* del grupo B, se exacerbó la neumonía inducida por VPRRS, sugiriendo que la presencia de *M. hyopneumoniae* con un mínimo de enfermedad clínica puede incrementar la severidad de la neumonía inducida por VPRRS. Estos hallazgos son consideraciones importantes en el manejo y control del CRP. Los resultados de este estudio sugieren que el control de la infección por *M. hyopneumoniae* puede ser importante en la disminución del impacto de la neumonía inducida por VPRRS en granjas porcinas y, por lo tanto, del CRP.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Halbur, P.G. Defining the Causes of PRDC. *Swine Consultant* 1996; fall:4-15.
2. Halbur, P.G. Primary Contributors to the PRDC. *ISU* 1996.
3. Ross, R.F. *Mycoplasmal diseases*, in *Diseases of Swine*, A.D. Leman, B. Straw, and R.D. Glock, Editors. 1986, Iowa State University Press: Ames, Iowa. p. 469-483.
4. Blanchard, B., et al., Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 1993;30:329-341.
5. Kishima, M. R.F. Ross. Suppressive effect of nonviable *Mycoplasma hyopneumoniae* on phytohemagglutinin-induced transformation of swine lymphocytes. *American Journal of Veterinary Research* 1985;46:2366-2368.
6. Messier, S., R.F. Ross, P.S. Paul. Humoral and cellular responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *American Journal of Veterinary Research* 1990;51:52-58.
7. Tajima, M., et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs immunosuppressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. *American Journal of Veterinary Research* 1984;45:1928-1932.
8. Poinon, A., M. Byrt, P. Heap. Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. *Australian Veterinary Journal* 1985;62:13-18.

9. Hill, H. Overview and history of mystery swine disease (fertility and respiratory syndrome). *Proceedings on the Mystery Swine Disease Committee Meeting 1990*; Colorado:29.
10. Mollitor, T.W., C.S. Choi, G. Leitner. Immunomodulation of host immune responses following porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1994.
11. Halbur, P.G., et al. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary Pathology* 1995;32:648-660.
12. Thacker, E.L., et al., Bacterial potentiation of a virus induced pneumonia. *Proceedings of the National Academy of Science* 1998; Submitted.

Tabla 1. Resumen de los registros de enfermedad respiratoria clínica de cerdos después de la inoculación con VPRRS, *M. hyopneumoniae*, o VPRRS y *M. hyopneumoniae*.

Grupo	1-3 DPI (n=20)	4-10 DPI (n=14)	11-14 DPI (n=8)
A	0.8±0.4 <sup>bH</sup>	2.4±0.7 <sup>a</sup>	4.1±0.5 <sup>a</sup>
B	1.6±0.4 <sup>a</sup>	2.4±0.5 <sup>a</sup>	3.7±0.6 <sup>a</sup>
C	2.2±0.8 <sup>a</sup>	2.6±0.5 <sup>a</sup>	2.9±0.6 <sup>b</sup>
D	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
E	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
F	0.6±0.3 <sup>c</sup>	1.9±0.4 <sup>b</sup>	2.1±1.4 <sup>b</sup>
G	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>

\* Días post inoculación. Los cerdos tenían 6 semanas de edad a los 0 DPI.

<sup>H</sup> Criterio: 0=normal; 1=disnea ligera y/o taquipnea al estresarse; 2= disnea ligera y/o taquipnea al estar en reposo; 3=disnea moderada y/o taquipnea al estresarse; 4=disnea moderada y/o taquipnea al estar en reposo; 5=disnea severa y/o taquipnea al estresarse; 6=disnea severa y/o taquipnea al estar en reposo.

<sup>a,b,c,d</sup> Dentro de cada columna, valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes (p<.001).

Tabla 2. Porcentaje de pulmón con lesiones neumónicas visibles en cerdos infectados con *M. hyopneumoniae*, VPRRS o ambos.

Grupo	Fecha de Necropsia					
	3 DPI		10 DPI		28 DPI	
	VPRRS <sup>H</sup>	<i>M. hyo.</i> <sup>I</sup>	VPRRS	<i>M. hyo.</i>	VPRRS	<i>M. hyo.</i>
A	8.2±4.5 <sup>b</sup>	0.2±0.3	50.8±15.9 <sup>a</sup>	4.1±4.1 <sup>a</sup>	42.9±7.5 <sup>a</sup>	7.7±5.7 <sup>a</sup>
B	12.3±6.0 <sup>b</sup>	1.6±1.7	48.8±26.4 <sup>a</sup>	1.3±2.2 <sup>b</sup>	15.6±14.5 <sup>c</sup>	3.3±5.9 <sup>b,c</sup>
C	42.8±12.8 <sup>a</sup>	0.01±0.02	29.5±9.1 <sup>b</sup>	2.5±3.1 <sup>a,b</sup>	28.8±14.1 <sup>b</sup>	7.2±8.1 <sup>a,b</sup>
D	0 <sup>c</sup>	0.1±0.1	0 <sup>c</sup>	0.9±2.1 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>	1.2±3.0 <sup>c,d</sup>
E	0 <sup>c</sup>	0.2±0.3	0 <sup>c</sup>	0.2±0.2 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>	8.3±4.0 <sup>a</sup>
F	13.7±5.8 <sup>b</sup>	0.1±0.2	56.5±12.7 <sup>a</sup>	0.05±0.1 <sup>b</sup>	0.8±1.59 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
G	0 <sup>c</sup>	0.1±0.3	0 <sup>c</sup>	0.02±0.05 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>

<sup>\*</sup> DPI=días post inoculación cuando se realizó la necropsia a los cerdos.

<sup>H</sup> Porcentaje de pulmón exhibiendo neumonía inducida por VPRRS estimado visualmente.

<sup>I</sup> Porcentaje de pulmón exhibiendo neumonía inducida por *M. hyopneumoniae* determinado por dibujo de lesión y análisis de imagen.

<sup>\*</sup> Grupo C recibió VPRRS 10 DPI y *M. hyopneumoniae* 0 DPI, de manera que no hay relación con los otros grupos con respecto a DPI con VPRRS y fecha de necropsia.

<sup>a,b,c,d</sup> Dentro de cada columna, valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p < .001$ ).

Tabla 3. Registro de lesiones microscópicas de cerdos inoculados con VPRRS, *M. hyopneumoniae* o ambos.

Grupo	Fecha de Necropsia					
	3 DPI		10 DPI		28 DPI	
	VPRRS <sup>†</sup>	<i>M. hyo.</i> <sup>‡</sup>	VPRRS	<i>M. hyo.</i>	VPRRS	<i>M. hyo.</i>
A	1.2±1.1 <sup>b</sup>	0	4.0±0.9 <sup>a</sup>	1.7±1.0 <sup>a</sup>	4.8±0.7 <sup>a</sup>	3.9±0.4 <sup>a</sup>
B	1.0±0 <sup>b</sup>	0.3±0.5	3.3±1.5 <sup>a</sup>	0.8±0.4 <sup>b</sup>	1.3±0.5 <sup>b</sup>	1.6±1.1 <sup>c</sup>
C <sup>§</sup>	3.3±0.5 <sup>a</sup>	0	3.3±0.5 <sup>a</sup>	1.8±1.0 <sup>a</sup>	4.3±1.2 <sup>a</sup>	3.8±0.5 <sup>a</sup>
D	0 <sup>c</sup>	0.2±0.4	0 <sup>b</sup>	0.5±0.6 <sup>b,c</sup>	0.1±0.4 <sup>c</sup>	1.0±0 <sup>c</sup>
E	0.2±0.4 <sup>c</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0.5±0.6 <sup>b,c</sup>	0 <sup>c</sup>	2.5±0.8 <sup>b</sup>
F	1.5±0.8 <sup>b</sup>	0.3±0.5	3.7±0.8 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>	1.4±0.5 <sup>b</sup>	1.1±0.6 <sup>c</sup>
G	0.2±0.4 <sup>c</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0.8±0.4 <sup>b,c</sup>	0 <sup>c</sup>	0.3±0.5 <sup>d</sup>

<sup>†</sup> Días post inoculación cuando se realizó la necropsia a los cerdos.

† VPRRS: Criterio basado en la severidad de la neumonía intersticial. 0=sin lesiones microscópicas; 1=neumonía ligera; 2=neumonía difusa leve; 3=neumonía multifocal moderada; 4=neumonía difusa moderada; 5=neumonía multifocal severa; 6=neumonía difusa severa.

‡ *M. hyopneumoniae*: Criterio basado en la severidad del cúmulo peribronquiolar y perivascular y nódulo linfoide. 0=sin lesiones microscópicas; 1=cúmulo peribronquiolar y perivascular ligero y formación de nódulo linfoide; 2= cúmulo peribronquiolar y perivascular moderado y formación de nódulo linfoide; 3= cúmulo peribronquiolar y perivascular severo y formación de nódulo linfoide; 4= cúmulo peribronquiolar y perivascular muy severo y formación de nódulo linfoide.

§ Grupo C recibió VPRRS 10 DPI y *M. hyopneumoniae* 0 DPI, de manera que no hay relación con los otros grupos con respecto a DPI con VPRRS y fecha de necropsia.

<sup>a,b,c,d</sup> Dentro de cada columna para cada DPI, valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p < .001$ ).

Tabla 3. Registro de lesiones microscópicas de ciertos inoculados con VPRRS, *M. hyopneumoniae* o ambos. La tabla muestra el porcentaje de animales que exhibieron lesiones microscópicas de VPRRS, *M. hyopneumoniae* o ambas en los animales que recibieron VPRRS, *M. hyopneumoniae* o ambos. Los valores con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ( $p < .001$ ).

DPI: días post inoculación cuando se realizó la necropsia e los cerdos.  
 \* Porcentaje de pulmón exhibiendo lesiones inducidas por VPRRS estimado visualmente.  
 † Porcentaje de pulmón exhibiendo lesiones inducidas por *M. hyopneumoniae* determinado por diágnos de lesión y análisis de imagen.  
 ‡ Grupo C recibió VPRRS 10 DPI y *M. hyopneumoniae* 0 DPI, de manera que no hay relación con los otros grupos con respecto a DPI con VPRRS y fecha de necropsia.  
 § Dentro de cada columna, valores con diferentes superíndices son significativamente diferentes ( $p < .001$ ).

Grupo	VPRRS en M. DPI <sup>a</sup>	<i>M. hyopneumoniae</i> en M. DPI <sup>b</sup>	VPRRS en M. DPI <sup>a</sup>	<i>M. hyopneumoniae</i> en M. DPI <sup>b</sup>
A	1.2±1.1 <sup>a</sup>	0	1.2±1.0 <sup>a</sup>	1.7±1.0 <sup>a</sup>
B	1.2±0.9 <sup>a</sup>	0.3±0.5 <sup>a</sup>	1.3±0.9 <sup>a</sup>	0.8±0.4 <sup>a</sup>
C	3.3±0.5 <sup>b</sup>	0	3.3±0.5 <sup>b</sup>	1.8±1.0 <sup>a</sup>
D	0 <sup>c</sup>	0.2±0.4 <sup>a</sup>	0.1±0.4 <sup>a</sup>	0.3±0.3 <sup>a</sup>
E	0.2±0.4 <sup>a</sup>	0	0.2±0.4 <sup>a</sup>	0.2±0.3 <sup>a</sup>
F	1.8±0.8 <sup>b</sup>	0.3±0.5 <sup>a</sup>	1.4±0.5 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>
G	0.2±0.4 <sup>a</sup>	0	0.2±0.4 <sup>a</sup>	0.8±0.4 <sup>a</sup>