



24  
29.

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

"SEROPERFIL ENCONTRADO CON LA PRUEBA DE ELISA (GP1 DEL VIRUS  
DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY) Y AGLUTINACION EN PLACA (DE  
*Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPOS 1, 3, 5 Y 7)"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A

**CATALINA GARCIA HERNANDEZ**

DIRECTORES: DR. SUSANA MENDOZA ELVIRA

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

199

7



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVANZA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Seroperfil encontrado con la prueba de ELISA (gp1 del virus de la Enfermedad de Aujeszky) y aglutinación en placa (de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipos 1, 3, 5 y 7).

que presenta la pasante: Catalina García Hernández  
con número de cuenta: 8759857-9 para obtener el TÍTULO de:  
Química Farmacéutica Biológica

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Junio de 1996

PRESIDENTE Dr. Abel Ciprián Carrasco

VOCAL M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

SECRETARIO M. en C. Victor M. Zendejas Buitrón

PRIMER SUPLENTE M. en C. Andres Romero Rojas

SEGUNDO SUPLENTE O.F.B. Marcela Hernández Vargas

## DEDICATORIAS

A Dios por permitirme llegar a esta etapa de mi vida profesional.  
Gracias a la vida que me ha dado tanto.

A mis Padres:

Erasmus	García	Morales
Elvira	Hernández	de García

Gracias por haberme dado la mejor herencia: sus principios que me dieron de sí mismos, por todo el amor, paciencia, comprensión y apoyo que siempre me han brindado. Los quiero y los respeto.

A mis queridos hermanos:

Mauricio	Lucía
Martín	Carlos
Alfonso	Erasmus
Gregorio	Oscar

Por su comprensión, estímulo, ayuda, apoyo, cariño y consejos. Gracias los quiero.

Aunque ya no están con nosotros dedico esta tesis también a mis hermanos: Francisco y Ma. Eugenia; a mi abuelita Hermelinda y a mi tío Amansio, que estarían muy contentos y orgullosos.

A mis sobrinos:

Ma. Eugenia, Carlos, Elvira, Marisol, Francisco... Porque sus sonrisas logran hacer los momentos más agradables.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de tesis: Dr. Susana E. Mendoza Elvira y al Dr. Abel Ciprián Carrasco, por su ayuda y por su valiosa colaboración en la realización de este proyecto.

A quienes con su apoyo contribuyeron a este trabajo, gracias:

Al Q. F. B. Oscar Torres Angeles por su ayuda incondicional, por su amistad y por sus sugerencias.

Al M.V.Z. Froylan Hernández German por su ayuda incondicional y por todas sus sugerencias.

Al M.V.Z. Jesús Horacio Lara Puente por su amistad, sugerencias y por su ayuda incondicional.

Al I.Q. Francisco Jiménez A. por su ayuda en las correcciones .

Al Q.F.B. Jacobo Garibay Escobar y al Señor Rodolfo Robles por su apoyo en el material fotográfico.

Al Biólogo Alfonso Sánchez Zuñiga por el diseño de las diapositivas.

Agradezco al Laboratorio SmithKline Beecham, por la donación del paquete de diagnóstico ELISA (Pseudorrabies virus Gp 1+. Antibody Test Kit: Clean Ease - PRV), para la realización de esta tesis.

A mis amigas y compañeras:

Paty Revueltas, Rocío García V., Carolina García A., Claudia, Irene, Marisa, Victoria, Angelina, Ana Ma. Guzman G., Inocencia, Ma. Elena, Georgina Cedillo, Maribel Herrera, Guadalupe Canseco, Guadalupe Morales. En general a la generación 15ava de Q. F. B. Por todos los momentos agradables que compartimos.

A mis profesores : Ma. Ester Revueltas, Gertrudis Carrion Z., Gerardo Cruz J., Idalia Avila M., Leticia Zuñiga R., Andrea Becerril Osnaya, Maricela Noe M. y Ma. Eugenia Posada G. Por todos sus conocimientos y por su amistad.

**A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haberme dado la oportunidad de lograr otro de mis sueños, realizarme como profesionista.**

**A los miembros del Jurado:**

**Dr. Abel Ciprián Carrasco  
M. V. Z. Gerardo Cruz Jiménez  
M. en C. Victor M. Zendejas Buitrón  
M. en C. Andrés Romero Rojas  
Q. F. B. Marcela Hernández Vargas**

**Por las correcciones, sugerencias realizadas al presente trabajo y ayuda incondicional.**

**A todos los que de una u otra forma participaron en la realización de este trabajo.**

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de tesis: Dr. Susana E. Mendoza Elvira y al Dr. Abel Ciprián Carrasco, por su ayuda y por su valiosa colaboración en la realización de este proyecto.

A quienes con su apoyo contribuyeron a este trabajo, gracias:

Al Q. F. B. Oscar Torres Angeles por su ayuda incondicional, por su amistad y por sus sugerencias.

Al M.V.Z. Froylan Hernández German por su ayuda incondicional y por todas sus sugerencias.

Al M.V.Z. Jesús Horacio Lara Puente por su amistad, sugerencias y por su ayuda incondicional.

Al I.Q. Francisco Jimenez A. por su ayuda en las correcciones.

Al Q.F.B. Jacobo Garibay Escobar y al Señor Rodolfo Robles por su apoyo en el material fotográfico.

Al Biólogo Alfonso Sánchez Zuñiga por el diseño de las diapositivas.

Agradezco al Laboratorio SmithKline Beecham, por la donación del paquete de diagnóstico ELISA (Pseudorabies virus Gp 1+. Antibody Test Kit: Clean Ease - PRV), para la realización de esta tesis.

A mis amigas y compañeras:

Paty Revueltas, Rocío García V., Carolina García A., Claudia, Irene, Marisa, Victoria, Angelina, Ana Ma. Guzman G., Inocencia, Ma. Elena, Georgina Cedillo, Maribel Herrera, Guadalupe Canseco, Guadalupe Morales. En general a la generación 15ava de Q. F. B. Por todos los momentos agradables que compartimos.

A mis profesores : Ma. Ester Revueltas, Gettrudis Carrion Z., Gerardo Cruz J., Idalia Avila M., Leticia Zuñiga R., Andrea Becerril Osnaya, Maricela Noe M. y Ma. Eugenia Posada G. Por todos sus conocimientos y por su amistad.

SI SE PUEDE CUANDO ESTAS DECIDIDO(A), CUANDO COMPROMETES TU VOLUNTAD EN LOGRAR LO QUE DESEAS ALCANZAR CUANDO ANTE CADA OBSTACULO MUESTRAS TU TEMPLE Y CUANDO MAYOR DECISION LO EMPIEZAS A ENFRENTAR; SI ANTE CADA FRACASO BUSCAS RECONOCER TUS PROPIOS ERRORES LO QUE TE PERMITIRA ACUMULAR SABIDURIA Y TODOS TUS SUEÑOS REALIZAR; SI TIENES EL CORAJE DE VIVIR INTENSAMENTE Y HACES DE CADA DIA UNA FASCINANTE AVENTURA. SI SE PUEDE...

MIGUEL A. CORNEJO



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LA COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, UNAM, EN EL LABORATORIO DE VIROLOGIA, BAJO LA DIRECCION DE LA DR. SUSANA MENDOZA ELVIRA Y EL DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO.

# I N D I C E

Lista de Tablas	I
Lista de Figuras	II
Abreviaturas	III
Resumen	IV
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1. Pleuroneumonía Contagiosa Porcina	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Distribución e Importancia económica	1
1.3 Etiología	2
1.3.1 Características de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	2
1.4 Patogenia	4
1.4.1 Factores de patogenidad	5
1.4.1.1 Cápsula	5
1.4.1.2 Fimbrias citoadherentes	6
1.4.1.3 Lipopolisacáridos	6
1.4.1.4 Proteínas de membrana	7
1.4.1.5 Exotoxinas	8
1.4.1.6 Proteasas	9
1.5 Epidemiología	9
1.6 Signos clínicos	10
1.7 Diagnóstico	11
1.7.1 Diagnóstico Serológico	11
1.8 Tratamiento y Control	14
1.9 Vacunación	15
2. Enfermedad de Aujeszky	16
2.1 Generalidades	16

2.2 Distribución e Importancia económica	17
2.3 Etiología	17
2.3.1 Características del virus	18
2.4 Patogenia	18
2.5 Epidemiología	19
2.6 Signos Clínicos	20
2.7 Diagnóstico	20
2.7.1 Diagnóstico Serológico	20
2.8 Tratamiento y Control	20
3. Interacciones entre las enfermedades de PCP y EA	21
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	25
<b>III. HIPÓTESIS</b>	26
<b>IV. OBJETIVOS</b>	27
<b>V. MATERIAL Y METODOS</b>	28
5.1 Lugar del trabajo	28
5.2 Muestreo estratificado	28
5.2.1 Primer muestreo	28
5.2.2 Segundo muestreo	28
5.2.3 Tercer muestreo	28
5.3 Métodos	28
5.3.1 Prueba del PLEUROTTEST	29
5.3.2 Prueba de ELISA	30
5.3.2.1 Preparación de reactivos	30

<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>IX. REFERENCIAS</b>	<b>48</b>

## Lista de tablas

	1
<b>Tabla 1.</b> Distribución geográfica de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	3
<b>Tabla 2.</b> Antígenos somáticos encontrados en <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y los serotipos que los contienen	7
<b>Tabla 3.</b> Factores de patogenicidad de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	9
<b>Tabla 4.</b> Seroperfil de la enfermedad de PCP. Primer muestreo	34
<b>Tabla 5.</b> Seroperfil de la enfermedad de EA. Primer muestreo	35
<b>Tabla 6.</b> Seroperfil de las enfermedades de PCP y EA. Primer muestreo	37
<b>Tabla 7.</b> Seroperfil de la enfermedad de PCP. Segundo muestreo	38
<b>Tabla 8.</b> Seroperfil de la enfermedad de EA. Segundo muestreo	39
<b>Tabla 9.</b> Seroperfil de las enfermedades de PCP y EA. Segundo muestreo	40
<b>Tabla 10.</b> Seroperfil de la enfermedad de PCP. Tercer muestreo	41

## Lista de figuras

II

- Figura 1. Seroperfil de la enfermedad de PCP. Porcentaje de reactores positivos. Primer muestreo 34
- Figura 2. Seroperfil de las enfermedades de EA. Porcentaje de reactores positivos. Primer muestre 35
- figura 3. Seroperfil de las enfermedades de PCP y EA. Porcentaje de reactores positivos. Primer muestreo 38
- Figura 4. Seroperfil de la enfermedad de PCP. Porcentaje de reactores positivos. Segundo muestreo 39
- Figura 5. Seroperfil de la enfermedad de EA. Porcentaje de reactores positivos. Segundo muestreo 40
- Figura 6. Seroperfil de las enfermedades de PCP y EA. Porcentaje de reactores positivos. Segundo muestreo 41
- Figura 7. Seroperfil de la enfermedad de PCP. Porcentaje de reactores positivos. Tercer muestreo 42

Ag	Antígeno
ALA	Acido aminolevulinico
Aps	Toxina de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
CAMP	Prueba de Christie, Atkins y Munch-Peterson
DNA	Acido desoxirribonucleico
EA	Enfermedad de Aujeszky
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Gp1	Glicoproteína 1
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisacarido
min.	minutos
ml	mililitros
m.o.	microorganismo
NAD	Nicotin adenina dinucleótido
nm.	nanometro
PCP	Pleuroneumonia Contagiosa Porcina
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
PRV	Virus de la pseudorrabia
µl	microlitro
µm	micrometro
NT	No tipificable
VEA	Virus de la Enfermedad de Aujeszky

Las enfermedades del aparato respiratorio del cerdo representan una importante causa de pérdidas económicas para la industria porcícola. La mayoría de estas neumonías se deben a interacciones sinérgicas entre virus y bacterias. Los agentes infecciosos son potencialmente capaces de producir lesiones pulmonares y algunos factores predisponentes, como condiciones ambientales, prácticas de manejo y factores nutricionales, intervienen para que se manifieste su poder patógeno. Por otra parte la gran escala de la producción porcina se ha convertido en un factor que agrava y difunde la infección pulmonar. La presente investigación tiene como objetivo fundamental determinar un seroperfil mediante la correlación serológica del VEA y la PCP que permitió identificar cual fue la infección inicial. Se realizaron tres muestreos estratificados con intervalos de tres meses cada uno de ellos. En el primer muestreo constó de 264 sueros que provienen de porcinos cuyas edades oscilaron de 0 a 26 semanas; en el segundo muestreo se analizaron 327 sueros que provienen de porcinos de 0 a 26 semanas de edad y finalmente en el tercer muestreo se emplearon 248 sueros porcinos de las 0 a 28 semanas de edad. Se utilizó la Prueba de aglutinación en placa PLEUROTTEST y la Prueba de ELISA. Con la prueba del PLEUROTTEST se determinó la presencia de anticuerpos contra la PCP hacia los serotipos 1, 3, 5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Y con el paquete del VEA (prueba de ELISA) se determinó la presencia de reactores positivos a la Enfermedad de Aujeszky. En el caso de la PCP (primer muestreo estratificado) mostró que el serotipo 1 fue el que se encontró en mayor porcentaje y para la EA, desde las primeras semanas había anticuerpos contra el virus de campo. En el segundo muestreo, el serotipo 3 fue el que predominó. Y el examen serológico de la EA reveló altos porcentajes de anticuerpos contra el virus de Aujeszky. En el tercer muestreo, para la PCP, el serotipo 3 fue el que se encontró en mayor porcentaje. Y con respecto a EA fue negativo.



## I. INTRODUCCION

### 1. Pleuroneumonía Contagiosa Porcina

#### 1.1 Generalidades

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP), producida por el *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) es una enfermedad mortal de los cerdos que produce pérdidas económicas importantes, debido a una pobre conversión alimenticia en los animales infectados crónicamente (90). La enfermedad puede variar desde un caso hiperagudo hasta el crónico, en donde la lesión aguda característica es una neumonía hemorrágica (90), necrosante, asociada a una pleuritis fibrinosa; en tanto que la lesión crónica se distingue por un tejido pulmonar consolidado, infartado y encapsulado (26, 31, 44, 84).

#### 1.2 Distribución e Importancia económica

La PCP se encuentra diseminada ampliamente a nivel mundial y la distribución geográfica de los diferentes serotipos indica que la prevalencia varía en diferentes partes del mundo (Tabla 1) (23, 84, 90).

El serotipo 1 es el que predomina en México, en los Estados Unidos los serotipos 1 y 5 son los más frecuentemente aislados (38, 43, 82, 105, 106, 124).

El crecimiento de la población mundial en las últimas décadas no ha venido respaldado por un crecimiento similar en la producción de carne y leche. Las limitantes en la producción animal están en gran parte asociadas a las enfermedades infecciosas (19).

Las pérdidas económicas por neumonía están asociadas a muerte de animales, gastos de medicamentos, mayor consumo de alimentos de los portadores crónicos de la enfermedad; lo que hace que aumenten los costos y disminuya la disponibilidad de alimento en el mercado. Por lo que actualmente estas afecciones están consideradas como la principal causa de disminución en la productividad, especialmente entre cerdos de engorda (54, 74, 125).

Las pérdidas económicas son difíciles de evaluar si tenemos en cuenta que el número de cerdos afectados por la enfermedad varía de cerdo a cerdo dentro de una misma explotación (23).

Se ha reportado un descenso en la ganancia diaria de peso del 33.6% y una reducción en la eficiencia alimenticia del 25.5% en caso de cerdos afectados con PCP (126).

### 1.3 Etiología

La enfermedad en cerdos (ahora denominada PCP) es causada por el agente etiológico: *A. pleuropneumoniae* (26, 27, 28, 29, 119) que se describió en 1960 en California (55). Posteriormente, Shope (1964) fue el primero que aisló e identificó a *A. pleuropneumoniae* como el agente etiológico de la PCP (93, 123).

#### 1.3.1 Características de *A. pleuropneumoniae*

Se realizaron estudios sobre las bases fenotípicas y sobre el DNA de estas bacterias y se transfirió el género *Haemophilus pleuropneumoniae* al género *Actinobacillus pleuropneumoniae* dependiente de NAD biovariedad 1 y *P. hemolytica*-like a la especie *A. pleuropneumoniae* biovariedad 2 no dependiente de NAD (84, 89, 109).

*A. pleuropneumoniae* es Gram negativo (26, 28, 30, 46, 77, 92, 122), pleomórfico (26, 28, 92, 122), cocobacilo (28, 92, 93, 122, 123), el cual mide de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de largo por 0.3  $\mu\text{m}$  de ancho (28). En agar sangre se forman pequeñas colonias translúcidas con  $\beta$  hemólisis (38, 92, 105, 122). Es positivo a las pruebas de: CAMP (92, 105, 107, 111, 122), ALA (111), Ureasa (38, 105, 111) y catalasa (66,77). No forma esporas (77). Esta bacteria no tiene flagelos y posee fimbrias citoadherentes (66). Fermenta la glucosa, xilosa y manitol (111, 122).

Una característica importante de esta bacteria es su dependencia del factor de crecimiento V conocido con el nombre de NAD, pero no del factor X (28, 30, 105, 111).

Tabla 1. Distribución Geográfica de *A. pleuropneumoniae* (84)

País	Serotipos prevalentes (s)	Serotipos dominantes (s)	Referencias
Argentina	1,2,3,5	1	Vena et al. (1988)
Australia	1,2,3,7,NT	1	Eaves and Blackall (1988)
Bélgica	2,3,6,7,8,9,11,NT	3	Hommez et al. (1988,1990)
Brasil	1,3,4,5,NT	5	Piffer et al. (1986,1987)
Canadá	1,2,3,5,6,7,8, 10,12	1,5	Rosendal et al (1982); Mittal et al. (1982)
Chile	1,5	1,5	Olivares and Morgado (1988)
Checoslovaquia	1,2,7	2	Skollova and Gois (1987)
Dinamarca	1,2,3,5,6,7,8, 10,11,12	2	Nielsen (1982,1987)
Francia	2,3,7,8,9	9	Kobisch (1990)(comunicación personal)
Alemania	2,3,4,5,6,7,9,10	2,7,9	Schimmel and Hass (1983); Muller et al. (1986)
Hungría	1,2,3,5,6,7,10, 11,12	1,2	Fodor et al. (1989); Molnar (1990)
Italia	1,2,3,4,5,7,	5	Manzat et al. (1987); Sidoli et al (1987)
Irlanda	3, NT	3	Power et al. (1983)
Japón	1,2,3,5,6,7,8,9,12	2	Chan et al. (1978)
Corea	2,3,5,7	2,5	Kume et al. (1986)
México	1,2,3,4,5,6,7,8,9	1	Fukuyasu et al. (1991)
Holanda	1,2,3,5,7,8,9,11	2,9,11	Yeh (1990)
Noruega	2	2	Diaz et al. (1988)
Polonia	1,2,5,9	1	Ciprián et al. (1988)
España	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	4	Kamp et al. (1987)
Suecia	2,3,4	2	Falk et al. (1991)
Suiza	2,3,7,9	2	Molenda (1988); Tarasiuk
Reino Unido	1,2,3,5,6,7,8, 10	3	Ferri et al. (1990)
Estados Unidos	1,3,5,7,8,9	1,5	Gunnarsson (1979)
			Nicolet (1988)
			Hunter et al. (1983); Brandreth and Smith (1985)
			Schultz et al. (1983)

#### 1.4 Patogenia

Generalmente se acepta que portadores sanos juegan un papel determinante en la transmisión, éstos pueden ser identificados con pruebas serológicas. Experimentalmente se ha demostrado que los cerdos recuperados después de la infección son capaces de transmitirla por contacto directo a través de aerosoles a cerdos susceptibles (115).

La infección se transmite principalmente por el contacto de un cerdo a otro (24, 43). Durante los brotes de PCP agudos en la granja, la enfermedad se disemina de corral en corral, que se irradia desde ellas con una severidad e incidencia alta, sugiriendo el papel del aerosol en la diseminación de la enfermedad. También los cerdos pueden infectarse en forma indirecta, por el mismo personal de la granja, por medio de la ropa, botas e instrumental contaminado (24, 49).

Como vemos la transmisión de estas bacterias se lleva a cabo fundamentalmente por contacto directo. Este modo de transmisión se intensifica cuando: 1) Se utilizan corrales o jaulas que permiten el contacto y 2) Se mezclan constantemente animales de diferentes grupos.

La diseminación de esta enfermedad es rápida con elevada morbilidad y de un 20 a un 80% de mortalidad. La severidad de la infección ha sido relacionada con las condiciones medio ambientales y el estado inmune del huésped (114). Los portadores crónicos introducidos en granjas susceptibles pueden ser los responsables de severos brotes con altos índices de mortalidad y morbilidad (93, 114, 121, 122).

La patogenesis exacta no se conoce, pero algunos factores parecen ser importantes. Las investigaciones sugieren que la endotoxina es la causa inicial de los cambios patológicos (38, 92, 113, 121); porque es citotóxica para los macrófagos alveolares (38, 104, 121). Los complejos antígeno -anticuerpo destruyen el endotelio vascular, produciendo vasculitis y trombosis (114, 123); estos daños conducen a edema, infartos, necrosis, exudación y hemorragias, que son características de la PCP (127).

El tamaño de la partícula y el sitio de inoculación también son importantes en la patogénesis de la enfermedad, porque el tamaño pequeño de las partículas permite que las gotas penetren profundamente hasta el alveolo favoreciendo la infección; cuando esta penetración ocurre el macrófago alveolar se vuelve poco efectivo por el efecto de la endotoxina dando origen a la infección (38, 106, 107, 113, 121).

La muerte de los cerdos se produce generalmente por choque endotóxico debido a las endotoxinas o lipopolisacáridos; componentes estructurales de la membrana de las Gram negativas.

Además de estos, *A. pleuropneumoniae* tiene componentes que puede evitar la respuesta inmune y ayudan a colonizar el tracto respiratorio (90): fimbrias que facilitan la adhesión a los tejidos (128, 129); cápsula que inhibe la fagocitosis (64); hemolisina (36, 37); moléculas receptoras de membrana, que permiten tomar el hierro, un elemento esencial para su crecimiento (53, 95); citotoxinas que inactivan macrófagos, neutrófilos y otras células inmunes (39) y factor de permeabilidad (74). Sin embargo, estos mecanismos de patogenicidad no están bien comprendidos (Tabla 3) (90).

Las citolisinas (ahora Apx), son calcio dependientes para su síntesis y su actividad (36, 51). La patogenicidad parece estar relacionada a la actividad hemolítica que da cualquier colonia (68, 72). La hemolisina tipo I (HLyI) ha sido purificada, homogenizada y caracterizada como una  $\alpha$  hemolisina similar a la *Escherichia coli* demostrada por inmunotransferencia utilizando anticuerpos policlonales de conejo (90).

Se ha propuesto el nombre de citolisinas por ser el más apropiado. La citolisina ClyI (105 KDa) es equivalente a HlyI, la proteína ClyII (103 KDa), es equivalente a HLYII y la proteína ClyIII (120 KDa) es equivalente a HLYIII. Estas toxinas de *A. pleuropneumoniae* son denominadas actualmente como ApxI, ApxII y ApxIII (60, 68).

#### 1.4.1 Factores de Patogenicidad

*A. pleuropneumoniae* posee varios factores de patogenicidad que interactúan entre ellos para producir en el cerdo la PCP.

##### 1.4.1.1 Cápsula

La cápsula es la responsable de la especificidad del serotipo, en el presente se reconocen 12 serotipos designados con números arábigos del 1 al 12 (30, 31).

Todos los autores coinciden en que la cápsula juega un importante papel en la virulencia e inmunidad (90).

Los anticuerpos generados contra la cápsula sólo protegen contra la muerte, pero no contra las lesiones pulmonares y las infecciones crónicas. La virulencia atribuida a la cápsula es variable entre los diferentes serotipos, y aunque es requerida para que un *A. pleuropneumoniae* sea virulento, aún no se conoce por completo el papel patogénico de la cápsula (30, 31).

Dentro de las propiedades biológicas de la cápsula se mencionan las siguientes: son inertes, no tienen actividad tóxica (como la reacción de Schwartzman), tampoco tienen actividad pirógena. Sin embargo; se ha encontrado que mata al embrión de pollo, presenta actividad

blastogénica linfocitaria; debido a la carga negativa que le confiere la cápsula, hay resistencia a la fagocitosis por neutrófilos, es opsonizado por los anticuerpos e interfiere con la actividad del complemento hacia la membrana (31, 46).

#### 1.4.1.2 Fimbrias Citoadherentes

En México se han realizado una serie de trabajos que mostraron que cuando se inocularon a cerdos, conejos, ratones y cuyes por nebulización con *A. pleuropneumoniae* (en una cámara de aerosoles) solamente los cerdos se infectaron y murieron con inóculos que variaron de  $2 \times 10^4$  hasta  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia/ml (UFC/ml). Estas evidencias muestran la alta especificidad de especie de *A. pleuropneumoniae* hacia el cerdo sugiriendo; probablemente, que el cerdo posee receptores específicos hacia el factor de adherencia de esta bacteria (31, 94).

En otros estudios se han identificado en *A. pleuropneumoniae* proteínas semejantes a fimbrias o a pilis citoadherentes denominadas también adhesinas. Sin embargo no se han encontrado estos apéndices extracelulares en *A. pleuropneumoniae* cultivados *in vitro* y al parecer sólo la bacteria expresa estos antígenos en el cerdo. Recientemente se han identificado estas estructuras mediante microscopía electrónica, donde se demuestra que *A. pleuropneumoniae* presenta factores de adherencia o pilis citoadherentes en el cerdo, mientras que estas estructuras sólo se mantienen en los primeros pases de la bacteria en los medios de cultivo (30, 31).

#### 1.4.1.3 Lipopolisacárido

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar una membrana externa, que estructuralmente es idéntica a la membrana celular o interna, sólo que en ésta se encuentra ubicado el LPS. En *A. pleuropneumoniae* se encuentra un antígeno somático denominado O, situación que no ocurre con las bacterias del género *Haemophilus*, por lo que el término de LPS no se aplica y sí el de Lipooligosacáridos (30, 31).

La estructura del antígeno O es variable entre los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae* y se compone de glucosa principalmente, galactosa, rabinosa, azúcares aminados como la N-acetil glucosamina y la N-acetil galactosamina. Las propiedades biológicas del LPS se resumen en las siguientes actividades: tiene la actividad biológica clásica de una endotoxina de las Gram negativas. El LPS de *A. pleuropneumoniae* gelifica a los amebocitos del género *Limulus*; cuando se inocula por vía intradérmica se produce una reacción de Schwartzman, también el LPS

actúa como pirógeno. El LPS de los diferentes serotipos induce una infiltración de células inflamatorias cuando se inocula a ratones y cerdos por vía respiratoria, observándose una neumonía fibrinohemorrágica necrótica clásica de la PCP (30, 46, 47).

Las cepas de *A. pleuropneumoniae* son clasificadas en 7 tipos en base a sus antígenos somáticos como se muestra en la Tabla 2 (30).

Tabla 2. Antígenos somáticos encontrados en *Actinobacillus pleuropneumoniae* y los serotipos que los contienen (30).

SEROTIPO	SEROTIPO
1	O:1
2	O:2
3	O:3
4	O:4
5	O:5
6	O:3
7	O:4
8	O:3
9	O:1
10	O:6
11	O:1
12	O:7

#### 1.4.1.4 Proteínas de Membrana externa

El perfil de las proteínas localizadas en la membrana externa, se ha estudiado en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae*. Basándose en la movilidad electroforética de estas proteínas, la migración ocurrió de la siguiente manera: en las regiones de 39 a 44 kDa; de 16 a 16.5 kDa y en la región de 29 kDa correspondiente a proteínas modificables por el calor, por lo que se han identificado 7 patrones en 9 serotipos probados (30, 31).

Las proteínas de membrana externa de los serotipos 1 y 9 son idénticas (estos serotipos presentan reacción cruzada por sus antígenos capsulares), así como los serotipos 2 y 6 (estos serotipos no cruzan por sus antígenos capsulares), los serotipos 3, 4, 5, 7 y 8 presentan perfiles proteínicos diferentes; estos serotipos sólo cruzan por sus antígenos capsulares de la siguiente manera: el 3 con el 8, el 4 con el 7 y el 5 no cruza con los demás (31, 46).

#### 1.4.1.5 Exotoxinas

En los sobrenadantes de los cultivos de *A. pleuropneumoniae* se ha encontrado actividad tóxica sobre diferentes células, tales como linfocitos y macrófagos alveolares; pero principalmente contra glóbulos rojos. Esta actividad funcional ha determinado que a factores tóxicos se les denomine hemolisinas (ahora Apx)(31).

Se han identificado tres tipos distintos de actividad en las citotoxinas de *A. pleuropneumoniae*: Citolisina I (Cly); Citolisina II (ClyII) y Citolisina III (Cly III). Se han encontrado cepas de *A. pleuropneumoniae* que son citotóxicas pero no hemolíticas (31, 89). También encontró que la Citolisina I la producen los serotipos 1, 5, 9 y 11; así mismo la Citolisina II la producen prácticamente todos los serotipos; mientras que, la Citolisina III la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8 (88, 89).

Estas citolisinas no muestran diferencias antigénicas entre serotipos, aunque son antigénicamente diferentes entre ellas; la actividad hemolítica de esta proteína es probablemente la responsable de las lesiones iniciales de la PCP, caracterizadas por ser hemorrágicas y necróticas (30, 31).

Se ha descrito una prueba de neutralización de la citolisina usando sobrenadante de cultivo de *A. pleuropneumoniae* como fuente de citolisina. Esta prueba ha mostrado varias ventajas sobre las pruebas convencionales como serían: no son serotipo específicas; pero permiten diferenciar entre animales vacunados y no vacunados y tienen buena sensibilidad. Sin embargo tienen problemas de especificidad porque la HLyl muestra reacciones cruzadas con una variedad de bacterias en las que se incluyen *Escherichia coli* y *Pasteurella hemolytica* (30, 31).

Un grupo de investigadores de la Universidad de Minnesota ha modificado esta prueba y la hicieron más simple y específica. La prueba determina anticuerpos neutralizantes de la hemolisina; la presencia de dichos anticuerpos se interpreta como una infección por cepas de campo, diferenciándolos de aquellos anticuerpos producidos por vacunación. Aunque no se sabe la importancia práctica, esta prueba se puede realizar fácilmente en laboratorios con pocos recursos técnicos (30, 31).



La actividad hemolítica de las citolisinas 1 y 2 parecen ser las responsables de las lesiones iniciales caracterizadas por hemorragia y necrosis y al parecer también provocan un efecto tóxico sobre macrófagos, monocitos circulantes y polimorfonucleares (127).

#### 1.4.1.6 Proteasas

El papel de la secreción de las proteasas de *A. pleuropneumoniae* como factores de patogenicidad han sido poco estudiadas y existen trabajos contradictorios a este respecto (90).

Se ha estudiado algunas cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de los serotipos 1, 2, 3 y 5 y no se ha podido detectar actividad hemolítica contra ninguna inmunoglobulina porcina ni contra inmunoglobulina humana (87).

Se ha observado actividad hemolítica y proteolítica en el sobrenadante de cultivos de los serotipos 1 y 5 de *A. pleuropneumoniae*. El no las aisló, pero detectó un factor de permeabilidad. La importancia de las proteasas como factores de patogenicidad es evidente; ya que las cepas en las que se observa una actividad hemolítica reducida o ausente son incapaces de producir lesiones pulmonares en cerdos infectados. También se ha determinado la actividad proteolítica en sobrenadantes de cultivo de *A. pleuropneumoniae* (72). Los factores de patogenicidad se resumen en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Factores de patogenicidad de *A. pleuropneumoniae* (90).

ESTRUCTURA CELULAR	FUNCION	COMPOSICION
Fimbria	Adhesión	Proteínica
Cápsula	Inhibición de la Fagocitosis	Polisacárida
Citotoxinas	Toxicidad a células	Proteínica
Membrana externa	Choque endotóxico	Lipopolisacárido
Receptores	Captador de hierro	Proteínica
Factor de permeabilidad	No se conoce	No se conoce
Proteasas	Degradación de sustratos	Proteínica

#### 1.5 Epidemiología

*A. pleuropneumoniae* se transmite por vía aérea. Los portadores crónicos mantienen y difunden la enfermedad y aún cuando estos son introducidos en granjas no expuestas pueden ser los responsables de severos brotes con altos índices de mortalidad y morbilidad (92, 115, 121, 122).

Los brotes estan asociados con el estrés, hacinamiento, deficiente ventilación, humedad elevada. Los portadores sanos crónicos se asocian en los brotes en granjas cerradas (114, 115).

El cerdo es la única especie que en forma natural es susceptible a *A. pleuropneumoniae*. La morbilidad se puede presentar hasta un 100 % con una mortalidad variable que va desde el 20 hasta el 80%. La mortalidad se presenta en cerdos de cuatro semanas de edad, sin embargo, las pérdidas por muerte se encuentran limitadas en cerdos de 12 a 16 semanas de edad (27, 49).

### 1.6 Signos Clínicos

Los signos clínicos de la enfermedad dependen de varios factores : resistencia de los animales, edad, condiciones climáticas, grado de exposición y virulencia de la cepa, e infecciones secundarias (41, 46).

La enfermedad se presenta en forma hiperaguda, aguda y crónica. Los signos son variables y pueden manifestarse en forma de muerte súbita hasta una severa neumonía o una enfermedad respiratoria crónica (18).

En los casos hiperagudos es común que se presenten muertes repentinas sin que se presenten signos o lesiones externas en cerdos con buena condición física (111, 122). Si los signos son observados, ellos pueden incluir: fiebre alta, apatía, anorexia, dificultad respiratoria severa (92, 121, 122), diarrea ligera y vómito pueden presentarse especialmente como eventos terminales (121, 122).

En la forma aguda se presentan los siguientes signos: respiración por la boca, disnea, tos, depresión, fiebre y anorexia (92). La enfermedad se hace enzoótica en la granja después de la recuperación de un brote agudo (122).

Los signos de las formas subaguda y crónica son inespecíficos. Se puede presentar fiebre ligera, reducción del apetito, descenso en la ganancia diaria de peso y ocasionalmente se presentan muertes (4, 92).

La infección subclínica es común y se observa una pobre conversión alimenticia, descenso en la ganancia diaria de peso, retraso de la comercialización, aumento en los costos de producción y decomiso de canales. Se presenta una alta incidencia de lesiones pulmonares y pleuritis crónica (4, 122).

Se han reportado signos no respiratorios pero estos no son comunes: aborto en el último tercio de gestación (121), parálisis debida a abscesos que comprimen la médula espinal (127).

### 1.7 Diagnóstico

El diagnóstico de la PCP en países como México, se limita sólo a eso, al diagnóstico y no a la evaluación del estado inmune de la granja, prevención y control de la enfermedad. El diagnóstico serológico que podría ser útil para el control y erradicación de la enfermedad aunque no se lleva a cabo, debido principalmente a la necesidad de infraestructura costosa como son los laboratorios equipados y los recursos humanos capacitados (30).

Ante ésta disyuntiva un grupo de investigadores en México, han desarrollado un paquete de diagnóstico serológico de PCP empleando tecnología accesible y de bajo costo, con lo que se podrá conocer la situación de la granja con respecto a la enfermedad y así establecer las medidas de control convenientes o pertinentes. Este paquete de diagnóstico fue denominado PLEUROTTEST (Marca registrada por la U.N.A.M.) (30).

#### 1.7.1 Diagnóstico Serológico

Se han desarrollado numerosas pruebas serológicas y se ha demostrado la importancia del diagnóstico serológico de rutina en la prevención de brotes, en general se requieren un mínimo de 30 muestras para obtener un estado serológico confiable (42).

Para el diagnóstico de la PCP se emplean cuatro métodos, sin embargo; sólo algunos de ellos confirman la enfermedad y el serotipo presente. 1) El diagnóstico se basa en la observación de los signos clínicos; 2) Observaciones de las lesiones a la necropsia o durante la inspección en los centros de abasto de los casos crónicos; 3) Por el aislamiento y tipificación de *A. pleuropneumoniae* a partir de los pulmones y 4) El diagnóstico serológico que se lleva a cabo en los cerdos vivos de las granjas (28, 30).

Las pruebas serológicas son las más adecuadas ya que se pueden realizar en los animales vivos con o sin signos clínicos, no requiere de sacrificio de los cerdos, es más rápido y nos permite hacer seroperfiles de la enfermedad, identificando o localización de los cerdos infectados (28).

El seroperfil es un nuevo método de evaluación de la granja; los cuales consisten en el muestreo estratificado de animales de diferentes edades y etapas reproductivas de una población para determinar la proporción que tiene cada grupo de animales con anticuerpos específicos, contra

uno o varios microorganismos, con objeto de establecer la dinámica de la infección en la granja y definir las estrategias de control (85).

Por medio de los seroperfiles serológicos podemos conocer cuales son y como circulan los gérmenes patógenos en la granja. Se realiza o efectúa la detección de anticuerpos específicos en el suero como correlación de que el animal sufrió una infección con un microorganismo (en este caso *A. pleuropneumoniae* y/o el Virus de la Enfermedad de Aujeszky) (85).

Dependiendo de la enfermedad, la serología sólo indica que hubo infección pero no necesariamente que los animales están inmunes. Las pruebas se basan en la detección de anticuerpos circulantes (IgG e IgM) que podrían tener importancia en la inmunidad sistémica, pero no se evalúan los anticuerpos IgA secretora que pudieran ser protectoras contra las infecciones de las mucosas del tracto respiratorio, digestivo y reproductivo (85).

En el caso de la EA, con las pruebas de ELISA es posible determinar el porcentaje de animales que responden a la vacuna, el porcentaje de cerdos que están infectados con virus de campo. También podría definirse si hay interacción entre el VEA y *A. pleuropneumoniae*. Se debe de utilizar el seroperfil en las granjas de dos o tres sitios para conocer si efectivamente se está rompiendo el ciclo del virus (85).

Para *A. pleuropneumoniae* se puede determinar el grado de infección del pie de cría, los serotipos involucrados y la etapa en la que están colonizando (85).

Con esta información se puede determinar cuándo se debe vacunar, con que serotipos y si los métodos de control que se están llevando a cabo en la granja como son la antibioterapia, vacunaciones y manejo, están modificando en forma favorable la desaparición de la bacteria. Se puede conocer si hay asociación con otros agentes como el VEA, salmonelas, micoplasmas, entre otros (85).

Para el diagnóstico serológico de la PCP podemos mencionar las siguientes pruebas: aglutinación (86), aglutinación con partículas de látex, aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol (85, 86, 127), fijación de complemento, hemaglutinación indirecta (86), prueba de ELISA (127, 132.), contraelectroforesis (86), anticuerpos fluorescentes del tipo indirecto (127). Esta última prueba es rápida porque se realiza directamente sobre el tejido pulmonar y el cultivo no es necesario (127).

La prueba de fijación de complemento es una prueba demasiado complicada, la cual ocupa muchos controles, además de que el suero no debe de estar hemolizado. La mayor sensibilidad se obtiene usando cepas polis específicas (mezclas de antígenos, consistiendo de células completas de serotipos conocidos). Es útil para detectar la presencia o ausencia de *A. pleuropneumoniae*. Si se

obtienen resultados positivos con las cepas polis específicas, se pueden usar para antígenos monoespecíficos para serotipificar (127). Esta prueba es ampliamente utilizada para el diagnóstico serológico de las infecciones por *A. pleuropneumoniae*. A través de esta prueba se detectan los anticuerpos del tipo IgG, ya que los anticuerpos del tipo IgM son inactivados previamente por el calentamiento a 60 °C (75). Los sueros de los animales que presentaron un porcentaje de hemólisis mayor al 30% se considerarán negativos y los que tengan una hemólisis menor al 30% se considerarán positivos a la infección por *A. pleuropneumoniae* (75).

Las pruebas de aglutinación han sido de las más empleadas para la serotipificación de *A. pleuropneumoniae*. La interpretación de estas pruebas es de la siguiente manera: son positivos los sueros de los animales que presenten cualquier grado de aglutinación y son negativos aquellos que no muestren aglutinación (55).

La prueba de aglutinación en tubo, detecta la presencia de anticuerpos de la clase IgM e IgG. Para esta prueba se realizan diluciones desde 1:10 hasta 1:640. La interpretación de esta prueba puede ser graduada empleando cruces, dependiendo del tamaño de los floculos que se formen, de + a 4+. El título se determina como la máxima dilución del suero que da una reacción de 2+. Los sueros que tienen un título de 1:10 o mayor son considerados positivos (83).

En la prueba de aglutinación con partículas de látex, el antígeno (proteína o polisacárido) son adsorbidos sobre las partículas de látex, dicha prueba detecta anticuerpos de la clase IgM e IgG y los títulos de 1:8 o mayores son considerados positivos a la infección (83).

La prueba en tubo con 2-mercaptoetanol (2-ME-TA) detecta los anticuerpos de la clase IgG debido a que este compuesto tiene la particularidad de romper los enlaces disulfuro que forman la cadena pentamérica de la IgM inactivándola. Esta prueba puede detectar los anticuerpos de los animales infectados, en un tiempo más corto después de la infección que la prueba de fijación de complemento, ya que la prueba de 2-ME-TA detecta un 80% de los animales infectados a las 3 semanas postinfección por lo que la prueba de fijación de complemento detecta sólo el 33% (83).

La prueba de ELISA indirecta detecta anticuerpos de la clase IgG por medio de un anticuerpo anti-IgG marcado con una enzima, la cual normalmente es fosfatasa alcalina o peroxidasa. La interpretación de esta prueba se realiza marcando un valor de "corte" de densidad óptica, siendo este valor el límite de diferenciación entre los animales infectados y los animales sospechosos (92, 132).

La aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol y la prueba de ELISA se han propuesto como pruebas de rutina para el diagnóstico. Ambas pruebas son más específicas y sensibles que la prueba de fijación de complemento. Las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) son altamente

sensibles, específicas, económicas y se realiza en menos tiempo que la prueba de fijación de complemento (127).

Las técnicas inmunoenzimáticas son altamente sensibles (99%) y específicas (99%). Por otra parte son fácilmente automatizables, lo que permite que se procesen un alto número de muestras en un tiempo relativamente corto. En la mayoría de sus aplicaciones son comparables y normalmente superiores en estos aspectos a numerosas pruebas de diagnóstico y a muchas de las técnicas serológicas convencionales más sensibles: inmunofluorescencia, inmunoelectroforesis, y radioinmunoensayo. Actualmente la variable del método más usada es el método indirecto para detectar anticuerpos específicos (virales, bacterianos y parasitarios); a partir de suero, saliva y heces. La unión de anticuerpos específicos se revelan por el uso de conjugados antiglobulina. Este último reactivo es altamente específico para detectar todas las clases de anticuerpos (121). La principal ventaja es que se utilizan antiglobulinas "universales" (producidas en conejos y ratones) unidas a enzimas para detectar los anticuerpos. Otra ventaja es que tanto los antígenos como estos conjugados pueden ser estandarizados y la interpretación del ensayo es simple y fácilmente controlado. El uso de un primer anticuerpo y de una antiglobulina da al ensayo mayor sensibilidad que el método directo (120).

PLEUROTTEST es un equipo diseñado, el cual detecta anticuerpos producidos por los cerdos enfermos mediante un simple ensayo de aglutinación en placa. Esta prueba se basa en el principio de aglutinación directa. El suero del cerdo a diagnosticar se mezcla apropiadamente con el reactivo que contiene células tratadas de *A. pleuropneumoniae*. Son altamente sensibles y específicas, económicas, se realiza en unos minutos. Esta prueba tiene una sensibilidad de 86% y la especificidad es del 97%, por lo que la prueba de aglutinación en placa PLEUROTTEST esta recomendada como una prueba de campo de fácil realización en la misma granja (27, 28).

### 1.8 Tratamiento y Control

En los últimos años las estrategias de control se han enfocado sobre los principios fundamentales de la producción diseminados para limitar la transmisión del organismo y a la optimización de la resistencia a la presencia clínica de la enfermedad (16).

Una medida importante en el control de la PCP es canalizar en la granja los cerdos posiblemente infectados (127).

El tratamiento tiene un alto costo debido a que la inyección masiva de los cerdos, es incomoda y consume tiempo. La ventaja de la terapia es la reducción de la mortalidad. Sin embargo

El tratamiento tiene un alto costo debido a que la inyección masiva de los cerdos, es incomoda y consume tiempo. La ventaja de la terapia es la reducción de la mortalidad. Sin embargo hasta ahora el alto efecto económico del pobre crecimiento de los animales recuperados durante la resolución de las lesiones es substancial y casi siempre excede los costos por muertes del tratamiento (127).

Otras medidas son: limitar el estrés, no mezclar animales, mantener condiciones favorables de temperatura, ventilación y limitar la cantidad de polvo y reducir la densidad porcina (127).

En México y otros países es común la resistencia a penicilina y tetraciclinas. En Estados Unidos, los análogos de penicilina son generalmente efectivos; pero el patrón de la infección en la granja dificulta su uso (20).

En resumen *A. pleuropneumoniae* resiste a sulfonamidas, tetraciclinas, neomicina, estreptomycin, también se han reportado resistencia a lincomicina, bacitracina, cloxacilina, penicilina y ampicilina (38, 122, 127).

Con frecuencia el agua se medica para prevenir la difusión de la infección, también se puede medicar el alimento si el agua no puede ser medicada (111).

La vacunación y la medicación modifican el cuadro clínico, sin embargo no elimina al agente ni evitan el desarrollo de casos crónicos o subclínicos de la infección (18).

### 1.9 Vacunación

La PCP puede ser controlada por vacunación o por programas basados en el diagnóstico serológico. Estas medidas requieren de los serotipos prevalentes en esta área; sin embargo las vacunas con la capacidad de inducir inmunidad protectora contra *A. pleuropneumoniae* confiable no están disponibles comercialmente. Algunas reducen la mortalidad, pero ninguna es efectiva para prevenir la infección con *A. pleuropneumoniae* o el desarrollo de cerdos portadores capaces de eliminar la bacteria (20).

No es posible controlar *A. pleuropneumoniae* con una sola vacunación, especialmente en granjas altamente expuestas. En la vacunación empleando vacunas comerciales que contienen los serotipos prevalentes en un lugar se puede prevenir la mortalidad, pero no la infección, ni el descenso en el índice de crecimiento y las lesiones macroscópicas (4, 93, 122).

Las vacunas que contienen gel o hidróxido de aluminio como adyuvantes no han probado ser eficaces; aunque las vacunas con adyuvantes oleosos estimulan una respuesta de anticuerpos más completa, ellas producen también una extensa reacción granulomatosa (127).

Se ha investigado un adyuvante oleoso a base de cacahuete que es mucho menos irritante, pero su capacidad de incrementar la respuesta inmune no ha sido investigada completamente (127).

Lo mejor que se puede esperar con el uso de las vacunas actuales es la reducción de la severidad y de la mortalidad. Las vacunas son más efectivas cuando están hechas con el serotipo que causa la enfermedad clínica (20).

## **2. Enfermedad de Aujeszky**

### **2.1 Generalidades**

En los cerdos la enfermedad se caracteriza por presentar sinus encefalíticos. La enfermedad de Aujeszky (EA) causa una elevada mortalidad en animales lactantes (lechones). En cerdos adultos puede presentarse en forma subclínica o bien como una enfermedad respiratoria, en caso de no complicarse con otros agentes infecciosos, puede ser leve y de corta duración. Se considera una enfermedad primaria del cerdo, en los que presenta un curso en general benigno, salvo en lechones (18).

Los animales sobrevivientes de un brote, pueden permanecer como portadores del virus por periodos prolongados, puede exceder los tres meses (27).

La EA afecta tanto a animales domésticos como silvestres (14). La enfermedad es mortal en los cerdos lactantes, ser leve y de corta duración. Se considera una enfermedad primaria del cerdo, en los que presenta un curso en general benigno, salvo en lechones (18).

Los animales sobrevivientes de un brote, pueden permanecer como portadores del virus por periodos prolongados, puede exceder los tres meses (27).

La EA afecta tanto a animales domésticos como silvestres (18).

La enfermedad es mortal en los cerdos lactantes, en los cuales puede haber una mortalidad de hasta un 100% durante las dos primeras semanas de vida (104).



## 2.2 Distribución e importancia económica

El principal impacto económico de esta enfermedad se presenta como resultado del retraso en el crecimiento, la baja conversión alimenticia, la disminución de la tasa de fertilidad y el aumento en la mortalidad de los lechones (42). Por otra parte se ha determinado que entre el 30% y 60% de los cerdos de abasto presentan algún tipo de lesión pulmonar; y que por cada 10% de tejido pulmonar afectado, la ganancia diaria de peso se reduce a 34.7 gramos (126).

La EA está distribuida mundialmente y causa considerables pérdidas económicas en la industria porcina mundial (17, 57, 80, 81, 116).

Fue descrita por primera vez en 1902 por Aladar Aujeszky. En ese entonces se presentaba sólo en forma esporádica. A partir de los años 70's, y principalmente por causa del crecimiento e industrialización del sector porcino, la EA ha tomado una importancia creciente: siendo actualmente uno de los problemas sanitarios que mayores pérdidas ocasionan a la producción porcina (60, 101).

En México el primer brote reportado de la EA se presentó en 1943 en el Estado de Aguascalientes en bovinos, pero fue hasta el año de 1972 cuando se reportaron los primeros brotes en cerdos en el Estado de Jalisco (100).

## 2.3 Etiología

La EA es causada por un herpes virus, el cual pertenece a la familia herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, especie: herpesvirus simple 1 (17, 18, 27, 57, 80, 81, 112, 116), tiene un tamaño de 180 nm. El genoma consiste de DNA de doble cadena con cápside icosaédrica con 162 capsómeros, una envoltura fosfolipídica con peplómeros característicos. El virus es bastante resistente a altas temperaturas y a medios ácidos y alcalinos. El virus sobrevive 30 días en verano y 46 días en primavera, siempre y cuando este en lugares húmedos y protegidos del sol. Puede mantenerse liofilizado por dos años (27).

El virus es más termoestable y resistente a los cambios de pH que otros herpes virus, por lo que el virus puede resistir en el medio ambiente por semanas. El virus crece fácilmente en células de riñón de cerdo y conejo, células testiculares de cobayo y conejo, y fibroblastos de embrión de pollo. Por otra parte produce pústulas en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo (18, 20).

Puede resistir en fenol al 3 % y sobrevive durante 2 a 7 semanas en carnes y lugares infectados (18, 20). Es estable entre pH de 4 a 9 (18).

### 2.3.1 Características del virus de Aujeszky

Una característica de los herpesvirus es que se presenta una fase latente en el que el genoma viral persiste en tejido nervioso y linfoide. Las observaciones epidemiológicas ponen en evidencia la latencia del Virus de la Enfermedad de Aujeszky. El cerdo es el principal reservorio natural del virus (56, 70) y los animales recuperados de la enfermedad pueden pasar a un estado de infección latente; pero se puede originar la reactivación que produce nuevos ciclos de infección o introducir la enfermedad en explotaciones libres (29).

En cerdos jóvenes, la EA puede causar una alta mortalidad, mientras que en cerdos adultos persiste la infección en la forma latente (17, 57, 80, 81, 112, 116).

Los cerdos adultos albergan el virus, el cual puede transmitirse ocasionalmente a animales susceptibles. Así que la forma latente en infecciones repetidas puede afectar a los fetos de los cerdos (16).

Muchas de las propiedades físicas y químicas del VEA se han determinado en una actividad biológica, el virus afecta experimentalmente a conejos, pollos ratones y bovinos (7, 14, 48, 58, 78, 79).

Muchos estudios han demostrado la virulencia de las cepas del VEA en conejos, ratones pero estas no corresponden a su virulencia en los cerdos, el huésped natural. Porque las infecciones de la EA en cerdos causa grandes pérdidas económicas, la investigación se hizo en cerdos (110).

El uso de la inoculación intranasal, es un modelo de transmisión que se asemeja a la transmisión de la infección natural (110).

Existen múltiples evidencias de focos de infección por animales aparentemente sanos dentro de la explotación. En algunos casos la enfermedad no se manifiesta sino hasta 20 meses más tarde (18, 56).

La enfermedad de Aujeszky ataca a casi todas las especies de animales domésticos produciéndoles, un prurito intenso local y muerte en un lapso de 24 a 48 horas; excepto en los cerdos (18, 56, 70).

### 2.4 Patogenia

La transmisión directa de cerdo a cerdo se produce por las secreciones orales y nasales durante y después de la enfermedad natural. Los pájaros son altamente resistentes. La infección natural ocurre por vía nasal y oral (18).

Los cerdos se infectan principalmente por inhalación de aerosoles con el virus o por contacto nasal entre animales sanos y enfermos. La infección por vía oral se produce al consumir alimentos o leche contaminada (98, 101). También existe la transmisión durante la monta, inseminación artificial o intrauterinamente por vía placentaria al embrión o al feto (60, 62, 63).

El virus es difundido principalmente a través de las secreciones nasales en especial a partir del sexto día posinoculación, cuando ya hay aumento de temperatura. Una vez que el virus penetra por vía oral y/o nasal, éste se multiplica en nasofaringe; posteriormente es excretado en el exudado nasal por varias semanas (18, 81). El VEA se multiplica en órganos linfáticos (tonsilas y ganglios) del área nasofaríngea y pasa por vía de los nervios olfatorios y glosofaríngeos al sistema nervioso central (18, 27).

También puede pasar por vía respiratoria a los pulmones existiendo algunas cepas capaces de provocar neumonías que con frecuencia suelen complicarse con gérmenes bacterianos oportunistas (27).

## 2.5 Epidemiología

En condiciones naturales el VEA suele tener un curso terminal (agudo y mortal) en la mayoría de especies afectadas excepto en el cerdo, donde la enfermedad es leve en animales adultos y grave en lechones, por lo que esta especie está considerado como un reservorio natural del virus (56, 57, 70).

En general cada virus herpes tiene como hospedadores a una o muy pocas especies animales (14, 18). Sin embargo, el VEA puede hospedarse en la mayoría de los mamíferos y experimentalmente en muchas aves (18).

Afecta a: los cerdos (principalmente en la edad fetal y en los que tienen pocas semanas de edad); los cerdos adultos son muy resistentes), bovinos, ovinos, caprinos, perros, ratas y ratones (18). Los animales que se han recuperado de la enfermedad pueden pasar a un estadio de infección latente. La reactivación de los virus latentes se considera una de las formas más importantes de transmisión y persistencia en la explotación porcina, de la enfermedad (117, 118).

Existen diversas evidencias acerca de la importancia creciente de la enfermedad; hasta los años 60's los reportes concernían principalmente a bovinos y la incidencia se consideraba como baja. A partir de los años 70's la infección en los cerdos adquiere importancia económica en diversos países a causa del gran número de casos registrados y pérdidas ocasionadas (11, 25, 110).

## **2.6 Signos clínicos**

En los cerdos la morbilidad y la mortalidad dependen de la edad de los animales y disminuyen con la edad creciente, los lechones y los cerdos jóvenes corren el riesgo de enfermarse. Con otras especies el curso de la infección es usualmente letal y la recuperación es una excepción (18).

En la infección natural se han observado formas leves con fiebre, anorexia, sonido nasal y bajo porcentaje de mortalidad. En las formas severas los animales presentan además vómito, postración y síntomas nerviosos como: excitación incoordinación, movimientos en círculo; esta forma clínica se acompaña de altos índices de mortalidad (12, 40, 98).

Los signos clínicos son pérdida de tono, desorden de movimientos, temblor, fiebre, convulsiones, depresión y salivación excesiva que provocan que la enfermedad se confunda con la rabia. Los síntomas en el humano son secreción nasal y neumonía (12, 40, 98).

## **2.7 Diagnóstico**

### **2.7.1 Diagnóstico serológico**

Existen numerosos ensayos serológicos para la EA; los más importantes son : Aglutinación con partículas de látex, hemaglutinación pasiva, Seroneutralización, ELISA, entre otras (2, 52). La ventaja de ELISA sobre FC es que se presentan menos falsos negativos (20).

Los procedimientos serológicos usados para valorar la exposición al virus después de una vacunación son de valor limitado ya que ellos no pueden distinguir los cerdos infectados de forma natural de los cerdos vacunados (24, 32).

## **2.8 Tratamiento y control**

Diferentes estrategias de control y erradicación han sido implementadas en varios países contra esta enfermedad (18).

Diferentes vacunas vivas o inactivadas han sido ampliamente usadas en diversas estrategias para el control de la EA, sin embargo, con el sólo uso de la vacunación no ha sido posible erradicar la enfermedad (3, 100).

Entre dichos recursos figuran los inmunoensayos y las vacunas diferenciales que son compatibles con su aplicación en una campaña de erradicación. Tales vacunas y sus respectivos paquetes de diagnóstico, permiten el uso de programas de vacunación en las granjas (3, 100).

La forma más efectiva para la erradicación de la Enfermedad de Aujeszky es el muestreo y eliminación de animales seropositivos; la gran desventaja de esta estrategia es el alto costo cuando la prevalencia de la enfermedad es alta (96).

Las vacunas no previenen la infección sino únicamente la manifestación clínica de la enfermedad (18, 96).

### 3. Interacciones entre las enfermedades de PCP y EA

La atención con respecto a los problemas respiratorios, ha sido enfocada en los últimos años hacia *A. pleuropneumoniae* y Neumonía Enzoótica. Aunque la revisión de la literatura nos indica que también otros agentes bacterianos, virales, pueden ser importantes en las enfermedades respiratorias (61, 67, 74, 131).

Aquí solamente nos referimos a los agentes primarios más relevantes. Como agentes primarios incluimos a *A. pleuropneumoniae* y el Virus de la Enfermedad de Aujeszky.

Los agentes primarios son aquellos que por sí solos son capaces de producir enfermedad, sin la necesidad de otros factores (97).

El efecto sinérgico, es más marcado cuando los agentes involucrados son dos agentes primarios. Es decir, que el daño que cada uno de estos puede producir separadamente en las vías respiratorias, se ve todavía incrementado, cuando actúa conjuntamente con otro agente primario que afecte al aparato respiratorio. Tal es el caso de lo que Matthews y Pattison demostraron en 1961, cuando al inocular a cerdos intratraquealmente con virus de Fiebre Porcina Clásica desarrollaron signos de la enfermedad con ligera lesión pulmonar y al adicionar *Haemophilus parainfluenzae* al inóculo que contenía el virus, se agravaron los signos y las lesiones del sistema respiratorio (43).

La intervención del VEA como agente primario en el desencadenamiento de la neumonía porcina ha sido poco estudiada. Sin embargo, existen observaciones a nivel de campo y experimental de la asociación de este virus con agentes bacterianos en el establecimiento del proceso neumónico (5, 7, 71, 129), así como de su patogenicidad para el pulmón y de que algunos brotes de la enfermedad en el cerdo de engorda se han caracterizado por problemas respiratorios asociados a signos nerviosos discretos (6, 99).

En explotaciones no inmunes, la enfermedad se caracteriza por un cuadro pulmonar agudo de rápida evolución y elevada mortalidad, pero también existen evidencias de infecciones subclínicas en explotaciones crónicamente afectadas (5).

Existen evidencias de que hay una marcada interacción entre los agentes virales y bacterianos en la presentación de neumonías en todos los animales domésticos (43).

La idea de que pudiera existir la interacción entre virus y bacterias fue concebida a raíz de las pandemias de influenza humana ocurridas durante el siglo pasado (29).

Tradicionalmente se había aceptado que un sólo factor como ya sean virus o bacterias eran responsables de la mayoría de los cuadros neumónicos del cerdo (66). Sin embargo actualmente se acepta que en la mayoría de los casos las causas de las neumonías se debe a una gran variedad de agentes que interactúan entre sí y que provocan cuadros clínicos y lesiones de mayor severidad, donde la colonización del pulmón es eminente por bacterias que forman parte de la cavidad nasal (73).

La interacción entre virus y bacterias en el tracto respiratorio es un fenómeno ampliamente reconocido como factor desencadenante de neumonía, tanto en el hombre como en distintas especies animales (34, 133). A partir de las observaciones hechas durante las pandemias de Influenza humana ocurrida en el siglo pasado y durante el presente, se originaron las teorías del sinergismo entre las infecciones virales y bacterianas en la producción de neumonía (65).

La inoculación de virus y bacterias en el ratón, ha sido uno de los modelos más frecuentemente utilizado para demostrar la interacción de infecciones combinadas de ambos agentes microbianos en la producción de afecciones respiratorias (22).

En cerdos convencionales se han descrito dos evidencias concretas que han demostrado la interacción entre virus y bacterias en el establecimiento del proceso neumónico. Se ha demostrado una interacción entre el virus de la Influenza porcina y *Haemophilus influenzae suis*, en el cual se observó que la infección viral se agravaba considerablemente con la secuela bacteriana (28).

En otros estudios (101), se ha observado en cerdos de engorda un marcado sinergismo entre el virus vacunal del Cólera porcino inoculado por vía intramuscular y *Pasteurella multocida* administrada por la vía intratraqueal. Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que hubo un aumento en el grado de lesión neumónica (entre los 3 y 5 días) en los animales expuestos a ambos agentes. Estas lesiones consistieron en congestión y hemorragia (101).

Se ha reportado que es común encontrar brotes de PCP como resultado de que los animales se infectaron previamente con el virus de la EA que es altamente inmunosupresor (43).

La primera comprobación en que una bacteria no provoca daño alguno por sí sola y que interactúa con virus en el desarrollo del proceso neumónico fue realizado por Pijoan y Ochoa (101), quienes demuestran una marcada sinergia entre el virus vacunal de la Fiebre Porcina Clásica y *Pasteurella multocida* (29, 102).

Se tienen ciertos antecedentes que sugieren que la Enfermedad de Aujeszky que facilita la colonización y daño pulmonar por otros agentes como el *A. pleuropneumoniae* y son (45, 50):

- a) El virus se puede multiplicar en nasofaringe, tráquea y pulmón, produciendo lesiones leves en el tracto respiratorio (9, 10, 13, 21, 33).
- b) En el cerdo de engorda la enfermedad tiende a manifestarse en forma subclínica, pudiendo pasar desapercibida o causar con alteraciones respiratorias pudiendose acompañar de leves alteraciones nerviosas (1).
- c) Las cepas pneumotropas, las atenuadas naturalmente y las cepas vacunales se comportan en forma similar en sus marcadores de virulencia (29, 106).
- d) En explotaciones porcinas con más de 100 reproductoras la enfermedad tiende a establecerse en forma enzoótica (1, 101, 122). El virus en este caso continúa circulando, bien por rupturas en la inmunidad de la granja o por la capacidad del virus para establecerse en forma latente. Ambas situaciones en armonía podrían explicar la existencia de ciclos de reinfección que se manifiestan en forma clínica leve y respiratorias en los cerdos de engorda (29).
- e) Existen trabajos sobre unidades de engorda con problemas respiratorios que indican la presencia del virus de influenza porcino aunado al VEA, en el que esté último se encuentra en mayor proporción (29, 87).

Para determinar la asociación entre el *A. pleuropneumoniae* y el VEA se realizaron varios estudios. En el primer estudio, se utilizaron 60 pulmones con lesiones características de PCP y 40 sin lesiones aparentes; aplicando las técnicas bacteriológicas para el aislamiento de *A. pleuropneumoniae* y serológicas para la detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky. Los resultados mostraron que *A. pleuropneumoniae* se recuperó en 57 (95%) de los pulmones con lesiones características de PCP; mismos que resultaron positivos a la serología contra el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) (29). En cuanto a los pulmones sin lesiones aparentes, no se logró aislar *A. pleuropneumoniae*; pero 14 (35%) de ellos resultaron positivos al VEA, por serología. El análisis estadístico reveló la asociación entre estos dos agentes (29).

Un segundo estudio consistió en determinar la dosis mínima de *A. pleuropneumoniae* por lo que se formaron cinco grupo de cerdos desafiados por nebulización con las dosis de  $2 \times 10^4$  hasta  $2 \times 10^8$ ; también se determinó el grado de lesión pulmonar, y el de mortalidad, así como el tiempo de muerte. La dosis encontrada fue de  $2 \times 10^4$  (29).

En el tercer estudio se buscó comprobar la hipótesis anterior. Para ello se utilizaron cerdos recién detestados que se encontraban libre de anticuerpos contra el cólera porcino y de la

enfermedad de Aujeszky. Se vacunaron contra el VEA y se distribuyeron en cuatro grupos de cuatro animales cada uno; designándose al azar en los siguientes tratamientos: Grupo I, testigo; II, nebulizado (en grupo, en una cámara de nebulización para cerdos) con 14 ml de una suspensión bacteriana que contenía  $2 \times 10^8$  de *A. pleuropneumoniae* serotipo I; Grupo III, inoculado por vía intranasal con 1800 DICT<sub>50</sub> del virus y, posteriormente (3 a 5 días), nebulizado con 14 ml de una suspensión bacteriana que contenía  $2 \times 10^8$  de *A. pleuropneumoniae* serotipo I (29).

Se registraron los signos clínicos, en la necropsia se determinó el porcentaje de área pulmonar afectada, y se realizaron estudios bacteriológicos, histopatológicos y de inmunofluorescencia de los órganos afectados. Los resultados de este tercer estudio revelaron que los cerdos se vacunaron contra la VEA quedaron protegidos contra la muerte; pero no así contra la infección respiratoria cuando fueron desafiados con la cepa virulenta (Grupo III). Los cerdos vacunados, al ser primero desafiados con el virus y después con una dosis mínima de *A. pleuropneumoniae*, desarrollaron un proceso grave de pluroncemonia. Los animales murieron en término de pocas horas y las lesiones agudas de PCP encontradas abarcaron más del 60% de la superficie pulmonar; siendo semejantes a las presentadas con la dosis de  $2 \times 10^8$  de *A. pleuropneumoniae* (29).

Estas evidencias explican que la vacunación contra el VEA no fué capaz de prevenir la multiplicación del virus en las vías respiratorias, ya que una dosis mínima de *A. pleuropneumoniae* fué suficiente para colonizar y matar a todos los cerdos por lo que se considera que existe una interacción entre el VEA y *A. pleuropneumoniae* (29). Probablemente este sucediendo lo mismo a nivel de campo, dado que después de presentarse la enfermedad de Aujeszky aparece la PCP en forma epizootica (29).



## II. JUSTIFICACIÓN

La aplicación de los seroperfiles contra diversas enfermedades del cerdo, hoy en día van adquiriendo importancia debido principalmente a que se localizan en la granja cerdos potencialmente infectados. Se ha demostrado que el VEA es un agente predisponente o bien puede hacer más severa la enfermedad y que esta involucrado en los brotes de *A. pleuropneumoniae* (43), es por eso que por medio de los seroperfiles podremos saber el comportamiento de los animales de la granja, utilizando paquetes de diagnóstico (Prueba de ELISA y Prueba de aglutinación en placa PLEUROTTEST) para detectar los niveles de anticuerpos contra las enfermedades de PCP y EA.

### III. HIPOTESIS

Se sabe que existen bacterias primarias, que si solas pueden generar la presentación de una enfermedad como es el caso de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y en el caso de los virus se sabe que en algunos casos pueden ser predisponentes o pueden generar la enfermedad por si solos como es el caso del Virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA). Por lo que la hipótesis de este trabajo se basa en demostrar si el VEA ayuda a *Actinobacillus pleuropneumoniae* mediante un seroperfil con un muestreo serológico estratificado que sólo lo observamos en un cuadro clínico.

#### IV. OBJETIVOS

##### OBJETIVO GENERAL

Determinar un seroperfil mediante la correlación serológica entre la Enfermedad de Aujeszky y la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, permitiendo identificar cual fue la infección inicial.

##### OBJETIVOS PARTICULARES

4.1 Demostrar con un paquete de diagnóstico denominado PLEUROTTEST la presencia de anticuerpos contra los serotipos 1, 3, 5 y 7 de *A. pleuropneumoniae*.

4.2 Demostrar a través de un paquete de diagnóstico (ELISA) los niveles de anticuerpos contra la EA.

4.3 Correlacionar la presencia de anticuerpos contra la PCP y la EA.

## V. MATERIAL Y METODOS

### 5.1 Lugar de trabajo

El trabajo experimental se realizó en los Laboratorios de Virología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán. UNAM.

### 5.2 Muestreo estratificado

El estudio se llevo a cabo en los Laboratorios de Virología, en la Unidad de Posgrado de la FES-C UNAM. Con un intervalo de tres meses en cada uno de los muestreos.

El estudio se realizó en el periodo de 1994-1995. Fue la misma granja para los tres muestreos, pero con diferentes animales tomados al azar y en diferentes tiempos. Los sueros se obtuvieron de la granja de San José Temascatio ubicada en Irapuato Guanajuato. En este estudio se tomaron sueros porcinos en diferentes tiempos porque los cerdos provienen de diferentes madres (cerdas). Los sueros se obtuvieron de la misma granja para los tres muestreos, pero con diferentes animales tomados al azar.

Un muestreo estratificado consiste en tomar al azar un número determinado de sueros porcinos en las diferentes etapas de producción (destete, crecimiento, desarrollo y finalización) al mismo tiempo. Este muestreo estratificado nos sirve para realizar un seroperfil (y no muestrear a toda la granja), además para muestrear a diferentes animales de la granja, para saber datos fidedignos.

#### 5.2.1 Primer muestreo

Se evaluaron sueros de 264 animales cuyas edades fluctuaron de 0 semanas de edad de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 26 semanas de edad.

#### 5.2.2 Segundo muestreo

Tres meses después se repitió con otro grupo de cerdos. Sueros de 327 animales de 0 semanas de edad, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 26 semanas de edad.

#### 5.2.3 Tercer muestreo

Seis meses después se trabajo con otro grupo de animales. Sueros de 248 animales cuyas edades oscilan desde las 0 semanas a 28 semanas de edad.

### 5.3 Métodos

Todos los sueros fueron probados para determinar la presencia de anticuerpos contra la PCP y la EA.

#### 5.3.1 Prueba del PLEUROTTEST

Todos los sueros colectados fueron probados con un equipo de diagnóstico serológico de la PCP fue denominado PLEUROTTEST (marca registrada por la U.N.A.M.) empleando antígeno de *A. pleuropneumoniae* serotipos 1, 3, 5, y 7. Los anticuerpos contra la PCP se determinaron con la prueba ya antes mencionada, la cual es una prueba de aglutinación en placa, que detecta los anticuerpos producidos por los cerdos portadores de la enfermedad (PCP).

PLEUROTTEST es una prueba de aglutinación en placa utilizada para identificar directamente los anticuerpos capsulares de *A. pleuropneumoniae* contenidos en el suero del cerdo de cualquier edad, PLEUROTTEST está diseñado para el diagnóstico *in vitro*.

PLEUROTTEST consiste en un método rápido que no requiere de equipo de laboratorio (25, 27), se realiza en unos cuantos minutos y solo requiere 30 µl de suero del animal a estudiar. Es una prueba de aglutinación directa en placa, que ofrece la única oportunidad de distinguir directamente en la propia granja si un cerdo ha sido infectado con *A. pleuropneumoniae*, además permite diferenciar anticuerpos producidos por una infección natural de los producidos por vacunación (27).

En el caso de un cerdo infectado con la PCP, su suero contiene anticuerpos específicos que reaccionan con los antígenos presentes en el reactivo produciendo una aglutinación característica por la aparición de grumos en la mezcla, indicando un resultado positivo. Si se trata de un cerdo sano, el suero normalmente no contiene anticuerpos contra este microorganismo, o si se trata de un cerdo vacunado contra la PCP, el suero contiene anticuerpos posvacunales, que no reaccionan con el reactivo, de tal forma que ambos casos la aglutinación no se produce y no se observan grumos, indicando un resultado negativo (25, 27).

#### Metodología:

- a) El frasco con el reactivo se deja a temperatura ambiente, durante 10 a 15 minutos.
- b) Utilizando una pipeta se coloca una gota del suero que se va a analizar en cada una de las cuatro celdas en la línea asignada a cada cerdo en la prueba.
- c) Se coloca una gota de reactivo de aglutinación en la celda que contiene la gota de suero y se mezclan con movimiento rotatorios utilizando un palillo mezclador.

d) Se agita la placa suavemente con movimientos ondulatorios durante 4 minutos y se efectúa la lectura.

La reacción de aglutinación es muy estable, pero se recomienda que las lecturas se lleven a cabo dentro de los 2 minutos después que se realice la prueba.

#### Interpretación:

Los sueros de los cerdos infectados con *A. pleuropneumoniae* de campo, mostrarán fuerte aglutinación, mientras que los sueros de los cerdos sanos y vacunados contra la PCP permanecerán sin grumos.

### 5.3.2 Prueba de ELISA

Los sueros fueron ensayados por medio de la Prueba de ELISA (Pseudorrabies Virus Gp. Antibody Test Kit; Clean Ease- PRV) ELISA indirecta se utiliza para determinar los anticuerpos contra el VEA. Esta prueba detecta la glicoproteína de los virus en animales de campo, la cual la presentan en su envoltura.

Las pruebas inmunoenzimáticas (Prueba de ELISA) se basan en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de tal forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) el complejo antígeno - anticuerpo quedará inmobilizado y por lo tanto, podrá fácilmente ser revelado mediante la adición de un sustrato específico, que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de espectrofotómetro o lector de ELISA. La variable del método más utilizada actualmente en el área de patología animal, es el método indirecto, que se basa en la utilización de un conjugado anti-inmuglobulina (anti IgG) marcada con peroxidasa, que se une al anticuerpo específico del antígeno. La prueba de ELISA puede ser empleada no sólo con fines diagnósticos, también puede ser empleada para determinar la prevalencia de una enfermedad o para monitorear el estado inmune de una granja; y de este modo constituirse como una herramienta de control y erradicación de enfermedades (121).

#### 3.3.2.1 Preparación de reactivos:

a) **Solución de lavado.** La solución de lavado debe estar concentrada a 10X, a temperatura ambiente. Antes de usarse, la solución se agita suavemente. La solución de lavado se prepara mezclando una parte de solución de lavado con una concentración de 10X con 9 partes de agua

destilada o agua desionizada. No debe de usar agua almacenada. Mezclar la solución perfectamente.

**b) Diluyente de anticuerpos anticierdo con conjugado HRP:** Anticuerpos anticierdo: Conjugado de HRP, con una concentración 100X, tiene que ser diluido en el anticuerpo anticierdo: Conjugado HRP diluyente (ejemplo: 100 µl de una concentración de 100X, añadida para 11 ml de conjugado diluyente por placa). Mezclar suavemente la solución, evitando que se forme espuma. El conjugado diluyente puede ser usado por un período de 12 horas.

**c) Solución de sustrato ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic-Acid):** Combinar volumen a volumen de Substrato A (cromógeno ABTS) y Substrato B (solución de peróxido de hidrógeno). (Ejemplo: 5.5 ml de Substrato A y 5.5 ml de sustrato B por placa). Agitar vigorosamente para mezclar los reactivos. La solución debe ser preparada 30 minutos previamente para ser usada y debe de ser usada dentro de un periodo de 1 hora.

**d) Preparación del control positivo, negativo y de una muestra de suero.** Preparar una dilución 1:5 de los controles o bien de las muestras de suero, por cuatro partes de muestra de solución diluyente con una parte del control o de la muestra de suero en un microtubo.

Debe de existir suficiente muestra de la solución diluyente para permitir una mezcla de 240 µl de solución diluyente con 60 µl de control o de la muestra de suero. Se preparan 300 µl de material diluyente para una dispersión de un volumen de 100 µl el cual se realiza por duplicado. El control positivo y negativo o de las muestras de suero deberían de ser preparadas 2 horas y dejar que se dispersen en cuadruplicado. Cambiar las puntas para cada muestra nueva. Después todas las muestras deben de ser diluidas; mezclar las muestras, agitarlas fuertemente antes de distribuir las en el placa de Clín Ease-PRV. Anotando la posición de cada muestra.

#### Metodología:

1. El equipo de diagnóstico debe de estar a temperatura (21°C - 25°C) 1 hora antes de ser usados agitarlos y evitar que se forme espuma en los reactivos.
2. Remover de las placas la envoltura (una lámina). Evitar que se desprenda rápidamente el botón de las placas. Las placas deben de ser usados en 24 horas después de desenvolverlos. Después de usar las placas se desechan.
3. Anotar las posiciones de la muestra sobre la hoja de trabajo del Clín Ease-PRV.

4. Poner 100  $\mu$ l de los controles diluidos o bien de las muestras dentro de los dos pocitos por duplicado. Evitar la formación de burbujas durante la mezcla y la aplicación de los pasos a seguir para prevenir resultados de falsos positivos o falsos negativos.
5. Cubrir las placas e incubar en un medio ambiente por 1 hora a 37° C.
6. Remover el contenido de los pozos por decantación y lavarlo en una tina.
7. Se realizan tres lavados en cada pozo con 300  $\mu$ l de solución de lavado diluido tres veces. Después del tercer lavado invertir la placa. Dejar firme la tira de toallas de papel o bien "golpearlas" en material absorbente, para remover el lavado residual del fluido. Lavar cada placa dos veces con agua destilada o agua desionizada. Sacudir el líquido y repetirlo. No permitir que las placas entren en el paso de agua o bien de lavado ya que puede ser una causa de variación. Tapar las placas para remover el agua residual antes de ser usada con el siguiente paso.
8. Poner 100  $\mu$ l de una dilución 1:100 de anticuerpos anticercario: Conjugado de HRP para cada pozo. Preparar todo en fresco.
9. Cubrir las placas e incubar y evitar la humedad por 1 hora a 37° C. Preparar la solución del Substrato ABTS antes de 30 mins.
10. Vaciar, lavar y secar los pocillos para repetir los pasos 7 y 8.
11. Poner 100  $\mu$ l de solución de Substrato ABTS en cada pozo. La solución de ABTS debería de ser nuevamente preparada con uno de los ensayos; alguna porción inusual debería de ser descartada o eliminada.
12. Incubar las placas por 30 mins. a temperatura ambiente.
13. Anotar los valores de absorbancia de las muestras y controles a 405 nm o preferiblemente a una doble longitud de onda a 405 - 409 nm. puede haber falsos positivos o falsos negativos; debido a errores en la determinación.
14. Calcular los resultados o valores de absorbancia promedio para los controles positivos y para los controles negativos. Y comparar los valores de las muestras problemas con ambos controles para ver si son positivos o bien son negativos (las muestras). Por estas razones puede dar falsos negativos: que el conjugado este muy diluido, el substrato es poco concentrado, el lavado es excesivo, el tiempo de incubación es corto, ausencia de controles, debido a estas fuentes de error la placa no tiene coloración. Y por estas razones puede dar falsos negativos: que el conjugado este muy concentrado, el lavado del conjugado defectuoso, debido a estas fuentes de error el problema es que hay poca diferencia entre los controles positivos y negativos.



## VI. RESULTADOS

En relación a los resultados obtenidos; en el caso del seroperfil realizado para la enfermedad de PCP en el primer muestreo se registran en la Tabla 4, donde se muestra que el porcentaje de reactores positivos presentes a diferentes edades encontrándose que para el serotipo 1: en las semanas 12 y 22 en un 8%, a la semana 14 en un 24%, a la semana 16 en un 44%, a la semana 18 en un 40%, a la semana 20 en un 28%, a la semana 24 en un 52%, en la semana 26 en un 60% de reactores positivos respectivamente. En el caso del seroperfil para el serotipo 3 se encontró que: en la semana 2 un 23%, en las semanas 12, 14, 18 y 26 un 8%, en las semanas 16, 20 y 22 un 4%, en la semana 24 un 24% de reactores positivos respectivamente; en las semanas 4, 6, 8 y 10 no hubo reactores positivos. En el caso de los serotipos 5 y 7 no se detectaron reactores positivos en este muestreo.

En la Figura 1 se observa el seroperfil realizado para la enfermedad de PCP (primer muestreo) donde se observo que los serotipos 5 y 7 nunca estuvieron presentes desde 0 a 26 semanas, para el serotipo 1 se presento a partir de la semana 6 y se ve un aumento significativo en la semana 16 y aumento a la semana 24, bajando en la semana 22 y aumentando nuevamente en la semana 26.

Los resultados del seroperfil de la Enfermedad de Aujeszky (EA) para el primer muestreo se muestran en la Tabla 5, donde se observa que: en las semanas 2, 4, 12 y 14 se obtuvo un 100%, en la semana 6 en un 50%, a la semana 8 en un 33%, a la semana 10 en un 20% de reactores positivos respectivamente.

En la Figura 2 se observa el seroperfil realizado para la Enfermedad de Aujeszky donde se observo que en las semanas 2 y 4 el 100% de los cerdos tenían anticuerpos contra el virus de campo proporcionados por la madre y que fueron decreciendo hasta la semana 10 en un 20%, pero a la semana 12 aumento nuevamente en el 100% de los cerdos presentándose anticuerpos propios del cerdo hacia la glicoproteína 1 (gp1).

Para interpretar la Figura 3 y Tabla 6, se juntaron los resultados obtenidos de las Figuras 1 y 2 en donde se muestra la respuesta de anticuerpos de ambas enfermedades.

Los resultados del seroperfil de la enfermedad de PCP en el segundo muestreo se observa en la Tabla 7, encontrándose que para el serotipo 3: en las semanas 2, 10 y 18 en un 5%, en la semana 14 en un 8% y en la semana 24 en un 10% de reactores positivos. En las semanas 4, 6, 8, 12, 16, 20, 22 y 26 no hubo reactores positivos. En los serotipos 1, 5 y 7 no hubo reactores positivos.

TABLA 4. SEROPERFIL DE LA ENFERMEDAD DE PCP. PRIMER MUESTREO (% DE REACTORES POSITIVOS).

SEMANAS	SEROTIPO 1	SEROTIPO 3	SEROTIPO 5	SEROTIPO 7
2	0	23	0	0
4	0	0	0	0
6	12	0	0	0
8	0	0	0	0
10	0	0	0	0
12	8	8	0	0
14	24	8	0	0
16	44	4	0	0
18	40	8	0	0
20	28	4	0	0
22	8	4	0	0
24	52	24	0	0
26	60	8	0	0

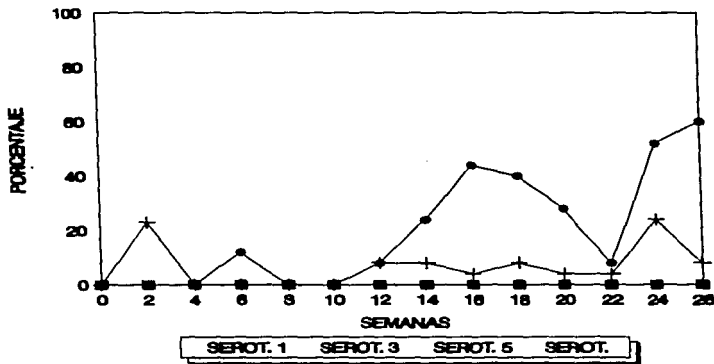


FIGURA 1. SEROPERFIL DE LA ENFERMEDAD DE PCP.

PRIMER MUESTREO.

TABLA 5. SEROPERFIL DE LA ENFERMEDAD DE EA. PRIMER MUESTREO (% DE REACTORES POSITIVOS)

SEMANAS	VEA gp1
2	100
4	100
6	50
8	33
10	20
12	100
14	100
16	100
18	
20	
22	
24	
26	

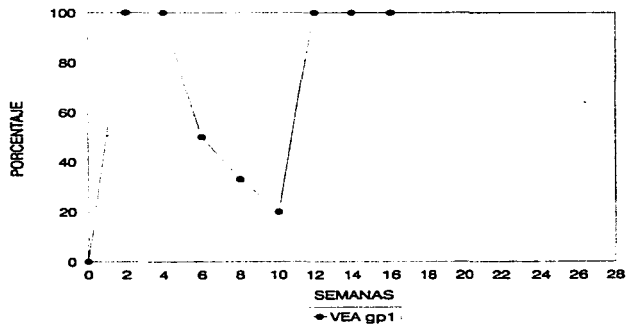


FIGURA 2. SEROPERFIL DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY. PRIMER MUESTREO

En la Figura 4 se observa el seroperfil realizado para la enfermedad de PCP (segundo muestreo) donde se observó que los serotipos 1, 5 y 7 nunca estuvieron presentes desde 0 a 28 semanas, para el serotipo 3 se presentó a partir de la semana 4 en bajo porcentaje (5%) y se ve un mínimo (leve) aumento a la semana 16, bajando en la semana 20 y aumento nuevamente en la semana 26.

Los resultados del seroperfil de la enfermedad de EA se muestra en la Tabla 8 donde se observa que en la semana 2 en un 77%, en la semana 4 en un 41%, en la semana 6 en un 70%, en la semana 8 en un 86%, en las semanas 10 y 18 en un 8%, en la semana 12 en un 48%, en la semana 14 en un 12%, en la semana 16 en un 28%, en la semana 20 en un 60%, en la semana 22 en un 96%, en la semana 24 en un 93%, en la semana 26 en un 17% de reactores positivos.

En la Figura 5 se observa el seroperfil realizado para la EA (segundo muestreo) donde se encontró que los anticuerpos virales estaban presentes en un aumento muy significativo en las primeras semanas, bajando en la semana 10 volvió a aumentar en la semana 12, pero a la semana 18 volvió a disminuir y aumento nuevamente en la semana 22, finalmente disminuyó a la semana 26.

En la Figura 6 y Tabla 9, muestra los resultados obtenidos de las Figuras 4 y 5 en donde se muestra la respuesta de anticuerpos.

Los resultados para el seroperfil realizado para la enfermedad de PCP en el tercer muestreo se muestra en el Figura 7 y Tabla 10, encontrándose que para el serotipo 3: en la semana 2 en un 50%, en la semana 6 en un 4%, en la semana 10 en un 46%, en la semana 12 en un 91%, en la semana 14 en un 54%, a la semana 16 en un 36%, a la semana 18 en un 52%, a la semana 20 en un 72%, a la semana 22 en un 79%, a la semana 24 en un 96%, a la semana 26 en un 61%, a la semana 28 en un 60% de reactores positivos.

Los resultados para el serotipo 1 son: a las semanas 4 y 8 no hubo reactores positivos. En la semana 10 en un 23%, a la semana 12 en un 65%, a la semana 14 en un 46%, a la semana 16 en un 64%, a la semana 18 en un 84%, a la semana 20 en un 76%, a la semana 22 en un 79%, a la semana 24 en un 62%, a la semana 26 en un 65%, a la semana 28 en un 48% de reactores positivos.

Los resultados para el serotipo 7 son: a las semanas 2 y 6 en un 4%, a la semana 14 en un 4%, a la semana 20 en un 12% de reactores positivos. En las semanas 4, 8, 10, 12, 16, 18, 22, 24, 26 y 28 no hubo reactores positivos. Los resultados para el seroperfil de la EA en el tercer muestreo fue negativo.

En la Figura 7, se observa el seroperfil realizado para la enfermedad de PCP (tercer muestreo) donde se observó que el serotipo 5 nunca estuvo presente desde 0 a 28 semanas, para el serotipo 1 se presentó a partir de la semana 10, y aumento a la semana 12, bajando en la semana

14, se ve un aumento significativo en la semana 18, bajando en la semana 24 y siguió bajando mas en la semana 28. Para el serotipo 3 se ve un aumento significativo a partir de la 2a semana, pero no se encontró en las semanas 4 y 8, bajando en la semana 6 (6%) y aumentando nuevamente en la semana 10, de nuevo se ve un aumento significativo en la 12a semana (91%), bajando en la semana 16, nuevamente se ve un aumento en la semana 24 y bajando nuevamente en la semana 28. Y los resultados del serotipo 7: se presento a partir de la semana 2 en bajo porcentaje, en las semanas 4, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y semana 28 no se detectó la presencia de anticuerpos, en la semana 6 se encontró un leve aumento, lo mismo sucedio en la semana 14 y se ve un aumento significativo en la semana 20.

TABLA 6. SEROPERFIL DE LAS ENFERMEDADES DE PCP Y EA. PRIMER MUESTREO (% DE REACTORES POSITIVOS).

SEMANAS	SEROTIPO 1	SEROTIPO 2	SEROTIPO 3	SEROTIPO 5	SEROTIPO 7	Nº VAGPI
2	0	23	0	0	0	100
4	0	0	0	0	0	100
6	12	0	0	0	0	50
8	0	0	0	0	0	33
10	0	0	0	0	0	20
12	8	8	0	0	0	100
14	24	8	0	0	0	100
16	44	4	0	0	0	100
18	40	8	0	0	0	
20	28	4	0	0	0	
22	8	4	0	0	0	
24	52	24	0	0	0	
26	60	8	0	0	0	

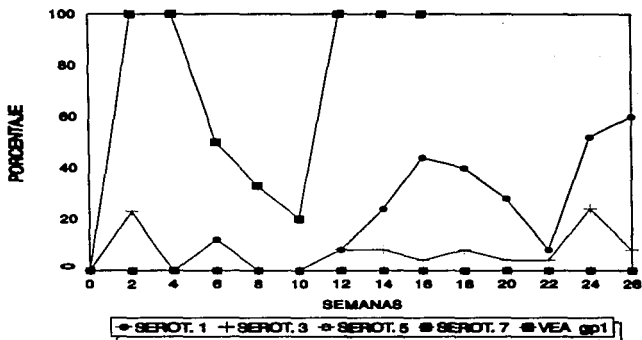


FIGURA 3. SEROPERFIL DE LAS ENFERMEDADES DE PCP Y EA.  
PRIMER MUESTREO.

TABLA 7. SEROPERFIL DE LA ENFERMEDAD DE PCP. SEGUNDO MUESTREO (% DE REACTORES POSITIVOS).

SEMANAS	SEROTIPO 1	SEROTIPO 3	SEROTIPO 5	SEROTIPO 7
2	0	5	0	0
4	0	0	0	0
6	0	0	0	0
8	0	0	0	0
10	0	5	0	0
12	0	0	0	0
14	0	8	0	0
16	0	0	0	0
18	0	5	0	0
20	0	0	0	0
22	0	0	0	0
24	0	10	0	0
26	0	0	0	0

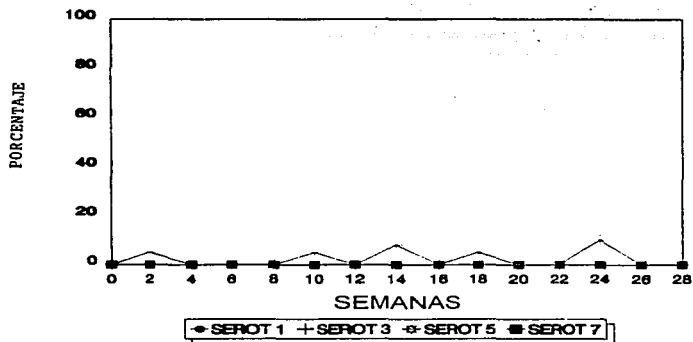


FIGURA 4. SEROPERFIL DE LA ENFERMEDAD DE PCP.  
SEGUNDO MUESTREO.

TABLA 8. SEROPERFIL DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY. SEGUNDO MUESTREO  
(% DE REACTORES POSITIVOS).

SEMANAS	VEG. GP.
2	77
4	41
6	70
8	86
10	8
12	48
14	12
16	28
18	8
20	60
22	96
24	93
26	17

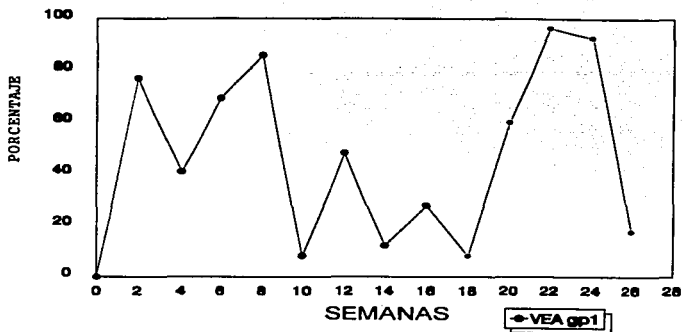
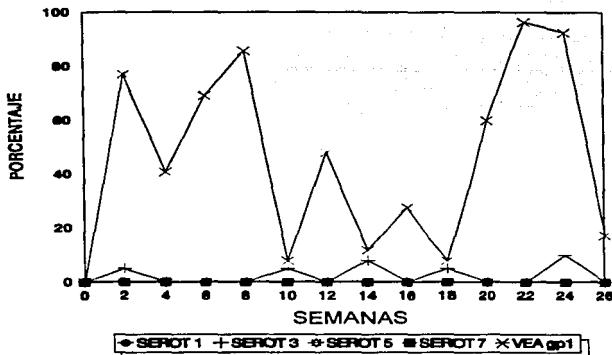


FIGURA 5. SEROPERFIL DE LA ENFERMEDAD DE EA.  
SEGUNDO MUESTREO

TABLA 9. SEROPERFIL DE LAS ENFERMEDADES DE PCP Y EA. SEGUNDO MUESTREO  
(% DE REACTORES POSITIVOS).

SEMANAS	SEROTIPO 1	SEROTIPO 3	SEROTIPO 5	SEROTIPO 7	VEA GP1
2	0	0	0	0	77
4	0	5	0	0	41
6	0	0	0	0	70
8	0	0	0	0	86
10	0	0	0	0	8
12	0	5	0	0	48
14	0	0	0	0	12
16	0	8	0	0	27
18	0	0	0	0	8
20	0	5	0	0	60
22	0	0	0	0	96
24	0	0	0	0	93
26	0	10	0	0	17





**FIGURA 6. SEROPERFIL DE LAS ENFERMEDADES DE PCP Y EA.  
SEGUNDO MUESTREO**

**TABLA 10. SEROPERFIL DE LA ENFERMEDAD DE PCP.  
TERCER MUESTREO.**

SEMANAS	SEROTIPO 1	SEROTIPO 3	SEROTIPO 5	SEROTIPO 7
2	0	50	0	4
4	0	0	0	0
6	0	4	0	4
8	0	0	0	0
10	23	46	0	0
12	65	91	0	0
14	46	54	0	4
16	64	36	0	0
18	84	52	0	0
20	76	72	0	12
22	79	79	0	0
24	62	96	0	0
26	65	61	0	0
28	48	60	0	0

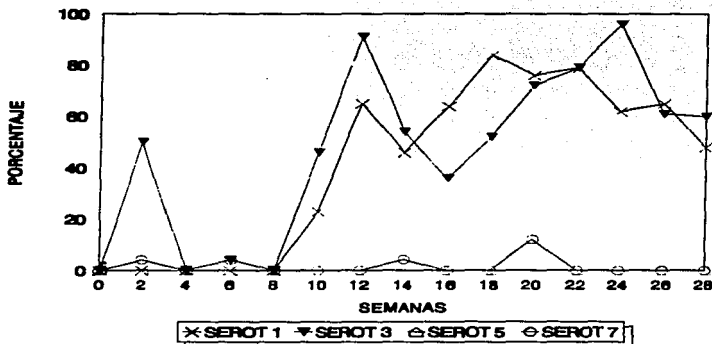


FIGURA 7. SEROPERFIL DE LA ENFERMEDAD DE PCP.  
TERCER MUESTREO

NOTA: CON RESPECTO A EA FUE NEGATIVO

## VII. DISCUSION

Los seroperfiles actualmente son indispensables en las industria porcícola nacional e internacional para tener soluciones apropiadas para cada granja, localizando los puntos de no infección. Ya que nos ayudan a saber cuales son los microorganismos y como circulan éstos en la granja: éstos consisten en el muestreo estratificado de animales de diferentes edades de una población total, para determinar la proporción que tiene cada grupo de animales con anticuerpos específicos contra uno o varios microorganismos, con el objetivo de establecer la dinámica de la infección en la granja y definir las estrategias de control. Los seroperfiles son de gran importancia para los porcicultores ya que le permite al veterinario, tomar las medidas adecuadas para el mejoramiento de la enfermedad.

El seroperfil (en el primer muestreo estratificado) encontrado para la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina reveló que los anticuerpos maternos (anticuerpos proporcionados por la madre) desaparecieron a la semana 8 y aparecieron los anticuerpos propios del cerdo (lechones) a partir de la semana 12, suben paralelamente los serotipos 1 y 3 pero en mayor proporción, a la semana 16 es el "primer pico máximo" (44% de reactivos positivos) de anticuerpos para la PCP serotipo 1 y declino a la semana 22; sin embargo suben a la semana 26 (60% de reactivos positivos) mientras que el serotipo 3 a la semana 24 (24% de reactivos positivos) (Tabla 4, Figura 1). El análisis serológico reveló para el Virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA) que a la semana 4 el 100% de los cerdos tenían anticuerpos maternos de virus infecciosos y que fueron decreciendo hasta la semana 10 para llegar a un 25%, sin embargo, de las semanas 12 a la 16 nuevamente el 100% de los cerdos mostraban anticuerpos hacia la gp1+ (Tablas 5 y 6; Figuras 2 y 3). Sólo se muestrearon los cerdos hasta la semana 16 porque desde la semana 12 hasta la semana 16 ya había un 100% de anticuerpos contra el virus infeccioso (esto indica que hay una alta prevalencia). Como vemos la madre (cerda) estaba infectada por el VEA y como consecuencia esta infecto a los lechones.

Cuando se resumieron en una misma (Figura 3), se observó que la presencia de anticuerpos contra el VEA correlacionaban con un alto porcentaje de reactivos positivos con la enfermedad de PCP, haciendonos pensar que hubo una predisposición (situación que ya se había demostrado)(43) sobre todo el serotipo 1 (Es el serotipo que predomina en México). La PCP estaba en la granja en forma enzootica y tuvo que intervenir un virus (VEA) para exacerbar la PCP. Entonces la estrategia fue vacunar (inmunizar) a los lechones contra la PCP con una vacuna comercial la cual contiene cultivos inactivados químicamente de *A. pleuropneumoniae* serotipos 1, 5 y 7 (es una vacuna polivalente, es decir que esta vacuna contiene varios serotipos de *A. pleuropneumoniae*). Esta

vacuna contienen en el sobrenadante toxinas y no cuerpo bacteriano. Para la EA se vacunaron a los lechones con una vacuna con defeción gp1'.

Los datos obtenidos en el Segundo muestreo estratificado (tres meses después), revelaron que sólo se encontraron anticuerpos contra el serotipo 3 de *A. pleuropneumoniae* y en un bajo porcentaje. Sólo en las primeras semanas y en bajo porcentaje (5 %) se encontraron los anticuerpos contra el serotipo 3 y en la semana 10 se incrementó leve los niveles de anticuerpos (Tabla 7, Figura 4). El estudio serológico mostró para el VEA que en la semana 2 el 77% de los animales tenían anticuerpos contra el virus y que fueron decreciendo a la semana 4 para llegar a un 42%, sin embargo se incrementó nuevamente a la semana 8 hasta un 86% y disminuyó en la semana 10 hasta un 8% (Tabla 8, Figura 5). En este muestreo se ve que los cerdos vacunados tienen anticuerpos contra el VEA es decir se ve una infección activa del virus de campo de EA. Aquí se observó claramente que la vacunación contra la PCP se controló pero "también" se controló el VEA clínico (Figura 6).

Los datos obtenidos en el tercer muestreo (6 meses después), revelaron que a las semanas 8 hasta la semana 12 suben en forma paralela o simultánea los anticuerpos contra los serotipos 1 y 3 pero en mayor proporción el serotipo 3, decrecen a la semana 14 el serotipo 1 y a la semana 16 el serotipo 3. Sin embargo, mientras decrecía el serotipo 3 se incrementaba el serotipo 1 a un pico máximo en la semana 18, mientras que los serotipos 1 y 3 en la semana 22 en donde el porcentaje de reactores positivos se igualaron a partir de esta semana, el serotipo 1 bajo y el serotipo 3 subió a un porcentaje de reactores positivos máximo en la semana 24 (96%), para la semana 26, el porcentaje de reactores positivos encontrados para ambos serotipos fueron similares pero muy altos para el serotipo 1. Seis meses después, de no llevar a cabo las indicaciones pertinentes que son buen manejo, vacunación y tratamiento, el problema de la PCP recurrió sin que nadie le ayudara, ya que la madre aún seguía infectando a sus lechones porque tienen anticuerpos infectantes en su suero que se vieron en la semana 2, por otro lado el VEA fue controlado ya que no se detectaron anticuerpos infectantes (AgGp1+) (Tabla 10 y Figura 7).

Los efectos que queríamos observar con la vacunación era que disminuyera el número de animales infectados con la PCP y la EA, ya que debido a estas enfermedades causan grandes pérdidas económicas debido a muertes de los cerdos. En los cerdos lactantes (lechones) les causa muerte, a las madres (cerdas) les causa abortos y en los cerdos (de finalización) les causa problemas a nivel de vías respiratorias. Y los objetivos de la vacunación son: tomar las medidas de control de la granja ya sea por medicación, vacunación y manejo de los cerdos.

Las pruebas serológicas (Prueba de aglutinación en placa PLEUROTTEST y Prueba de ELISA) son de gran utilidad ya que nos ayuda a diagnosticar enfermedades virales y bacteriales en animales de granja; como los seroperfiles, los cuales se utilizan para detectar por lo menos un animal positivo con respecto a la edad de los animales.

En cuanto a los sueros utilizados, son representativos estadísticamente, para determinar el porcentaje de reactores positivos que tiene cada muestreo o grupo de animales con anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae* y VEA.

Se ha evaluado la capacidad fagocítica (132) en cerdos inoculados experimentalmente, primero con *Mycoplasma hyopneumoniae* y posteriormente con *A. pleuropneumoniae* intranasalmente y mostró que los cerdos inoculados con ambos microorganismos mostraron los más severos signos y más extensas lesiones en comparación con cerdos inoculados con cada uno de los microorganismos por separado. Estos resultados indican que la infección previa con *Mycoplasma hyopneumoniae* exagera la PCP (122).

La EA en los cerdos adultos causa principalmente una enfermedad combinada tanto nerviosa como respiratoria o bien del tipo subclínico. El VEA en los cerdos adultos causa la colonización del aparato respiratorio por una gran variedad de agentes oportunistas, dentro de los cuales la *P. multocida* ocupa un lugar preponderante (18). El VEA es uno de los virus que afecta el pulmón de los cerdos en forma primaria o secundaria, el cual ejerce una marcada inmunosupresión en animales recuperados de la misma, y a su vez podrá encontrarse involucrado en muchas enfermedades (como la Enfermedad de Glässer y Pasteurelisis) difíciles de reproducir experimentalmente (18).

Con respecto a este estudio nos ayudo a darnos cuenta que por medio de los seroperfiles (perfiles serológicos) que el VEA es un factor que pueda predisponer a que se presente más severa la PCP. También se demostró que el serotipo más frecuente es el 1 y que después de llevar a cabo el primer muestreo y de realizarse el perfil serológico se localizan los puntos de no infección, recomendándose medicación y/o vacunación. Los resultados posteriormente al tratamiento en las granjas se reveló en el segundo muestreo donde desapareció el serotipo 1, que como se ha demostrado es el más severo.

Con la utilización de los paquetes de diagnóstico se puede conocer la situación de la granja con respecto a la enfermedad y poder así establecer las medidas de control necesarias (ya sea por medicación, vacunación y manejo de la granja).

Con la prueba de aglutinación en placa (PLEUROTTEST) nos ayuda a detectar anticuerpos en poco tiempo; esta prueba es fácil de realizar, es muy sensible (86%) y específica (97%), por lo

que se pueden trabajar con un gran número de sueros. Esta prueba detecta anticuerpos (IgG) contra la cápsula de *A. pleuropneumoniae* contenidos en el suero porcino.

La prueba de ELISA es de gran utilidad ya que nos ayuda a diagnosticar enfermedades virales y bacterianas en animales de granja, ya que nos permite realizar los seroperfiles. Esta prueba es muy sensible (99%) y específica (99%), por lo que se puede trabajar con un gran número de sueros. Esta prueba detecta anticuerpos contra la glicoproteína I (gpI) del VEA que son producidos contra la cepa de campo dando como resultado positivo mientras que los cerdos que fueron vacunados no la presentan.

### VIII. CONCLUSIONES

1. En base a este estudio se definió que el serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* tuvo alta prevalencia.
2. En el primer muestreo, nos indico el seroperfil que el VEA nos da señales de que hay una predisposición con el *A. pleuropneumoniae*.
3. De acuerdo a los resultados obtenidos, el serotipo 1 es el que predominó en el primer y segundo muestreo estratificado; en el segundo muestreo y tercer muestreo estratificado predominó el serotipo 3.
4. Las medidas sanitarias aplicadas del primer muestreo estratificado fueron satisfactorias pero no del tercer muestreo estratificado ya que se encontro nuevamente y predomina *A. pleuropneumoniae* serotipos 1 y 3.
5. Las pruebas de Aglutinación en placa PLEU'ROTEST y ELISA fueron utiles (en trabajos epidemiológicos, como el presente), para el estudio los seroperfiles de *A. pleuropneumoniae* y del VEA.

## IX . REFERENCIAS

1. **Alkermans, J. P. W. M.** 1976. Aujeszky's disease. *Ann. Med.*, 120:295-306.
2. **Anelli, F.J., Morrison, B. R., Goyal, M. S., Bergeland, E. M., Mackey, J. W.** 1991. Pig herds having a single reactor to serum antibody test to Aujeszky's disease virus. *Veterinary Record*. 128. 49-53.
3. **Arias, M., Moyano, M. Escribano, M. J., Sánchez V. M. J.** 1992. Evaluation of two ELISA Kits for the detection of Aujeszky's disease antibodies in pigs. *Veterinary Record*. 131. 391-393.
4. **Backstrom, L., Hoefling, D. C.** 1982. Respiratory diseases of swine. *Vet. Clin. N. Amer. Large Anim. Prac.* 259-276.
5. **Badola, S. J. I. y Pujols, R. J.** 1984. Estudios sobre la interacción del virus Ajeszky con *Pasteurella multocida* en los procesos neumónicos del cerdo. Tesis de maestría, Facultad de estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M., Cuautitlán Izcalli.
6. **Barradón, C. y Velasco, R.** 1984. Secuela de un brote de la enfermedad de Aujeszky. Memoria del simposio sobre el análisis y perspectivas de control de la enfermedad de Aujeszky en México. AMVEC. 34-44.
7. **Baskerville, A.** 1972. Aujeszky's disease encephalitis in pigs produced by diferent modes of infection. *Res. Vet. Sci.* 13: 394-396.
8. **Baskerville, A.** 1972. Ultrastructural changes in the pulmonary airways of pigs with a strain of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 43:127-132.
9. **Baskerville, A.** 1973. The histopathology of experimental pneumonia in pigs produced by Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 14: 223-228.
10. **Baskerville, A.** 1973. Ultrastructural changes in the lungs of pigs infected with Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 14: 229-233.
11. **Baskerville, A.** 1981. Aujeszky's disease: recent advances and current problems. *N. Z. Vet. J.* 29:183-185.
12. **Baskerville, A., Mc Merran, J. B., Dow, C.** 1973. Aujeszky's disease in pigs. *Vet. Bull.* 43: 465-480.
13. **Becker, C. H.** 1964. Zur bedeutung der lung für die pathologisch-anatomische diagnose der Aujeskitchen krankheit des schweines. *Monatsch. Veterinaermed.* 19:5-11.
14. **Becker, C. H.** 1968. Die multiplikation des Aujeskyischen virus in den spinalgaglien des kaninchens. *Archiv. für experimentelle veterinar medizín.* 23:363-381.



15. Belák, S., Ballagi, P. A., Flensburg, J. and Virtanen, A. 1989. Detection of pseudorabies virus DNA sequences by the 11 polymerase chain reaction. Arch. Virol. 108:279-289.
16. Ben-Porat, T., Deatly, A. M., Easterday, D. C., Galloway, D., Kaplan, A. S., McGregor, S. 1984. Latency of pseudorabies virus. Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci. 27: 365-383.
17. Bitsch, V. and Andersen, J. B. 1982. On the epidemiology of Aujeszky's disease in Denmark and the possibilities of its control. Ajesky's disease. Current topics in Veterinary Medicine and Animal Sci. G. Wittmann, S.A. Hall (Eds). Luxembourg. 236-277.
18. Blaxter, K. 1979. The limits of animal production. Vet. Rec. 105:5-9.
19. Brad, F. 1988. Actinobacillus pleuropneumoniae. Primera Reunión Internacional sobre afecciones del cerdo. Guadalajara, Jal. AMVEC. 10-23.
20. Bran, L., Suhaci, I. and Ursache, R. 1968. Experimental production of 1968. Experimental production of Aujeszky's disease by nasal instillation of culture virus. Arch. Vet. 5: 83-87.
21. Burch, D. 1982. The incidence and distribution of lung lesions associated with enzootic pneumonia. Proc. Int. Pig.
22. Caballero, C. S. 1985. Efecto del virus de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de Pasteurella multocida en cerdos de engorda. Tesis de Maestría. U. N. A. M. Cuautitlán Izcalli.
23. Carrión, G. M., Torres, A. O., Mendoza, E. S. y Ciprián, C. A. 1992. Epizootiología de Actinobacillus pleuropneumoniae papel de los roedores y pájaros en la transmisión de la Pleuropneumonía Contagiosa Porcina (PCP). Memorias del XXVII Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC). 1992. Acapulco, Gro. 1992. 54. AMVEC 1992. México.
24. Cartwright, S. 1982. Epidemiology and control of Aujeszky's diseases in Great Britain. In: aujeszky's disease. G. Wittmann, S.A. Hall (Eds.). Luxembourg.
25. Ciprián, C. A., Colmenares, V. G. y Mendoza, E. S. 1990. La enfermedad en México Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae. 1990. Editado por AMVEC. Guadalajara, Jal. 1990. 29-42.
26. Ciprián, C. A. y Hernández, B. E. 1990. Infecciones mixtas y vacunas. Memorias. symposium sobre enfermedades del cerdo con implicaciones en el comercio Internacional. (Editado por Morilla, A. y López). 1-6.
27. Ciprián, C. A. y Mendoza, E. S. 1990. Manual de la técnica estandarizada (PLEUROTTEST) en el Laboratorio de Microbiología de Enfermedades respiratorias del cerdo. FES-C. UNAM. Unidad de Posgrado. 1-21.
28. Ciprián, C. A. y Mendoza, E. S. 1991. Interacción del virus de la pseudorabia (o Enfermedad de Aujeszky) con bacterias involucradas en las afecciones respiratorias del cerdo. Vet. Méx., XXII.1: 23-28.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

29. Ciprián, C. A. y Mendoza, E. S. 1994. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Agente responsable de la Pleuroneumonía contagiosa Porcina. Memorias del Primer Ciclo Nacional de Afecciones respiratorias del cerdo. 83-94.
30. Ciprián, C. A. y Mendoza, E. S. 1995. Importancia de identificar el serotipo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina por la clase de citolisina excretada. Porciram. 6-20.
31. Coj, L. J. M., Ramírez, M. H., Mercado, G. C. 1993. Perfil serológico contra la enfermedad de Aujeszky en una granja porcina donde se aplica una vacuna con deleción de la glicoproteína. Memorias XXVIII. Congreso AMVEC, V Congreso ALVEC.94.
32. Corner, A. H. 1965. Pathology of experimental Aujeszky's disease in piglets. Res. Vet. Sci. 6:337-343.
33. Cowen, P., Guy, J., Erickson, G., Blanchard, D. 1990. Reactivation of latent pseudorabies virus infection in vaccinated commercial sows. Am. J. Vet. Res.
34. Degree, M. 1971. Combined viral-bacterial infection en el respiratory tract. 1971. An experimental study. Universitets for lagets. Trykingsentral, Oslo.
35. Devenich, J., Rosendal, S. 1991. Calcium bind to and is required for biological activity of the 104-kilodalton hemolysin produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Can. J. Microbiol. 37: 317.
36. Devenich, J., Rosendal, S., Hubler, J. R. 1989. Immunological comparason of 104-kilodaltons proteins associated with hemolysis and cytotoxicity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Pasteurella haemolytica* and *Escherichia coli*. Infect. Immun. 57:3210.
37. Didier, P. J. et al. 1984. Porcine Haemophilus pleuropneumoniae: Microbiologic and Pathologic findings. JAVMA. 184:716-719.
38. Dom, P., Maesebrouck, F. De Boetseller, P. 1992. Stimulation suppression of the oxygenation activity of porcine pulmon alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* its metabolites. Am. J. Vet. Res. 53:1113.
39. Dow, M. C., Ferran, J. B. 1962. The neuropathology of Aujeszky's disease in the pig. Res. Vet. Sci. 3:436.
40. Easterday, B. C. 1975. Disease of swine. Fourth edition. The Iowa State University Press. Iowa. U.S.A. 141-167.
41. Egger, W., Visser, N. 1994. Revisión de aspectos selectos de la enfermedad de Aujeszky. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de producción animal: cerdos. Porciram.9-18.
42. Eustic, S. L. 1982. Swinw pneumonia compend. Cont. Ed. 4: S311-S319.

43. Falcón, N. A. 1989. Efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky (Pseudo-rabia) sobre la presentación de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina. Tesis de Maestría. FES-C. U.N.A.M. Cuautitlán Izcalli. Edo de México.
44. Falcón, N. A., Paz de V. O., Morales, J., Batalla, C. D., alvarado, A., Sierra, N., Tórtora, P. J., Mendoza, E. S., Hernández, B. E., Camacho, M. J. y Ciprián, C. A. 1987. Sinergia entre el virus de la pseudorrabia (PRV) y *Haemophilus pleuropneumoniae* en la Pleuroneumonía Contagiosa. Memorias de la Reunión Anual de investigación pecuaria en México en 1987. México, D.F. 83-84.
45. Fenwick, B. W., Smeltzer, S. M. and Viker, K. 1989. Development and evaluation of a serum hemolysin neutralization assay for the diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. Proceedings of the 70 th conference of Research Workers in animals disease, Chicago, 1989.
46. Fenwick, B. W., Smeltzer, S. M., Vinker, K. 1989. Memorias de la Procc. 70 th Conference of Research Workers in Animal Disease. Chicago.
47. Field, H., T. J. 1974. The pathogenesis of pseudorabies in mice following peripheral inoculation. *J. of General Virology*. 23: 145-157.
48. Freese, W. 1990. Síndrome clínico y procedimientos de tratamiento para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Editado por AMVEC. Guadalajara. 9-15.
49. Frey, J., Bosse, J. t., Chang, V., Cullen, J. M., Fenwick, B., Gerlach, G. F., Grojil, D., Haesebrouckif, Inzana, T. J., Jansen, R. et al. 1993. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of hemolysin, cytolisins, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.* 139:1723.
50. Frey, J., Nicolet, J. 1990. Hemolysin pattern of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 28:232.
51. Fuentes, R. M. 1989. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades de Aujeszky (Pseudorrabia). Memorias del curso de enfermedades del cerdo. México. D. F. AMVEC. 32-39.
52. González, G. C., Caamano, D. L., Schryvers, A. B. 1990. Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 4: 1173.
53. Goodwin, R. F. W. 1971. The economics of enzootic pneumonia. *Vet. Rec.* 89:77-81.
54. Gunnarsson, A., Bibertein, E. L. and Hurvell, B. 1977. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: agglutination reactions. *Am. J. Vet. Res.* 38: 1111-1114.
55. Gustafson, D. P. 1975. Pseudorabies disease of swine. In: disease of swine. Edited by: Dunne, H. W., Leman, A. D. (Eds). 4th. Iowa State Univ. Press. Iowa. 391-410.

56. Gutekunst, D. E. 1979. Latent pseudorabies virus infection in swine detected by RNA-DNA hybridization. *Am. J. Vet. Res.* **40**:1568-1572.
57. Hagemoser, W. A., Kluge, J. P. 1984. Studies on the pathogenesis of pseudorabies in domestic cats following oral inoculation. *Canad. J. of comparative Medicine.* **44**:192-202.
58. Hoblet, K. H., Miller, G. B. and Barter, N. G. 1987. Economic assessment of pseudorabies epizootic, breeding herd remord repopulation and downtime in a commercial swine herd. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **190**:405-409.
59. Hsu, F. S., Liu, T. H. and Chung, W. B. 1984. Isolation of pseudorabies virus from semen and reproductive tract of adult boars. *Proceedings of the Int. Pig. Vet. Soc. Congress.* Ghent, Belgium, 24
60. Huhn, R. G. 1970. Swine enzootic pneumonia: incidence and rate of body weighgain. *Am. J. Vet. Res.* **31**:1007-1008.
61. Iglesias, G. 1987. Estudios sobre los métodos de transmisión del virus de la enfermedad de Aujeszky. *Med. Vet.* **4**:81-84.
62. Iglesias, G. and Harkness, J. W. 1988. Studies of transplacental and perinatal infection with two clones of a single Aujeszky disease (pseudorabies) virus isolate. *Vet. Microbiol.* **16**:243-254.
63. Inzana, T. J., Workman, J. M., Gogolewski, R. P. and Anderson, P. 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) pleuropneumoniae serotype 5. *Infection and immunity.* **56**:1880-1889.
64. Jacques, M., Bélanger, M., Roy, G. and Foisy, B. 1991. adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. *Vet. Microbiol.* **27**:133-143.
65. Jakob, G. J. 1981. Mechanims of virusinduced bacterial superinfections of the lung. *Clinics in Chest. Med.* **2**:59-66.
66. Jericho, K. W. F. 1968. Pathogenesis of pneumonia in pigs. *Vet. Rec.* **82**:509-516.
67. Kamp, E. M., Popma, J. K., Anakotta, J., Smits, M. A. 1991. Identification of hemolytic and cytotoxic of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **59**:3079.
68. Killian, M., Mesteck, J., Schroeblöcher, R. E. 1979. Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infect. Immun.* **26**:143.
69. Kojnok, J. 1965. The role of carrier sows in the spreading of Aujeszky's disease to suckling pigs, data on Aujeszky's virus carriership among fattening pigs. *Acta. Vet. Acad. Sci. Hung.* **15**:281-295.
70. Komal, J. P. S., Mittal, K. R. 1990. Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotype 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet. Microbiol.* **25**:229.

71. Lai, S. S., Chen, C. S., Huang, T. H., Ho, W. C. and Wang, F. Z. 1982. Persistent infection of a Pseudorabies virus contaminated swine herd, and eradication program and latent virus infection of seropositive sow. *Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Mexico*. 148.
72. Lallier, R., Leblanc, L., Morrisette, F., Higgins, R. 1987. Detection of a permeability factor produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Curr. Microbiol.* 15:141.
73. Little, T. W. A. 1975. Respiratory disease in pigs. A study. *Vet. Rec.* 96: 540-544.
74. Lombin, L. M., Rosendal, S. A., Mitachel, W. R. 1982. Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumoniae. *Canad. J. comp. Med.* 46:109-114.
75. Lugo, R. C., Torres, A. O., Mendoza, E. S., Tórtora, P. J. y Ciprián, C. A. 1989. Presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 2 en casos de PCP aguda. Memorias del XXV Congreso de AMVEC. Morelia, Michoacán, México. 353-355.
76. MacFaddin, J. 1994. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. De. Panamericana, México. 241.
77. Maes, R. K., Kanitz, C. L., Gustafson, D. P. 1979. Pseudorabies virus infections in wild and laboratory rats. *Am. J. Vet. Res.* 40:393-396.
78. McCrackens, R. M., McFerran, J. B. 1973. The neural spread of pseudorabies virus in claves. *J. of General virol.* 20: 17-28.
79. McFarlane, R. G., Thawley, D.G., Solorzano, R. F. 1986. Detection of latent pseudorabies virus in porcine tissue using a DNA hybridization dot-blot assay. *Am. J. Vet. Res.* 47:2329-2336.
80. McFerran, J. B., McCracken, R. M., Dow, C. 1984. The role of the carrier pig in the epidemiology of Aujeszky's disease. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 27:403-415.
81. Mittal, K. R. et al. 1983. Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.* 18:1351-1354.
82. Mittal, K. R., Higgins, R., Larivière, S., Leblanc. 1984. A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 45:715-719.
83. Mittal, K. R., Higgins, R., Larivière, S. and Nadeau, M. 1992. Serologic characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig in Quebec. *Vet. Microbiol.* 32:135-148.
84. Mittal, K. R., Higgins, R. and Larivière, S. 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation test for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 15:1019-1023.

85. Morilla, G. A. 1984. Los seroperfiles en la Clínica Porcina. Nuestro Acontecer Porcino. 9:65-74.
86. Motovsky, A. 1975. The role of Aujeszky's disease virus in the respiratory disease of swine. Vet. Med. Nauki. 12:40-44.
87. Mulka, M. H., Moxon, E. R., Bricker, J. Wright, A. Plant, A. G. 1984. Examination of *Haemophilus pleuropneumoniae* for immunoglobulin A protease activity. Infect. Immun. 45:276.
88. Nakai, T., Ono, E., I. K. and Kume, K. 1992. Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by use of purified capsular polysaccharide or lipopolysaccharide. Proceedings 12 th. Int. Pig. Vet. Soc. The Hague, Netherlands. 186.
89. Negrete, E. A., Tenorio, V., García, C., Godínez, D., Serrano, J. J., Álvarez, J. C. and De la Garza, M. 1994. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: virulence and gene cloning. Archives of Medical. 25:229-233.
90. Nicolet, J., Krawinkel, M., Baaugartner, A. 1981. An enzyme linked immunosorbent assay using an EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 42:3129-3132.
91. Nicolet, J., Scholl, E. 1981. *Haemophilus* infections. Diseases of swine. 5th. (A. D. Leman et al eds.) Iowa State University Press. Ames. 368-377.
92. Nicolet, J. and Könnig, H. 1966. Zur *Haemophilus-pneumoniae* beim schein. Bakteriologische, pathologische-anatomische und histologische befunde. Vorläufige Mitteilung. Pathol. Microbiol. 29:301-306.
93. Nielsen, R. 1974. Serological and immunological studies of pleuropneumoniae of swine caused by *Haemophilus paraaerolyticus*. Acta. Vet. Scand. 15:80-89.
94. Niven, D. F., Donga, J., Archibald, F. S. 1989. Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: changes in the outer membraneprotein profile and the removal of iron from porcine transferrin. Mol. Microbiol. 3:1083.
95. Oirebot, J. T., Van, Gielkens, A. L. T., Moormann, R. J. M. and Berns, A. J. M. 1990. Marker vaccines virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky disease. A. method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs. J. of Virological Methods. 22: 191-206.
96. Olander, H. J., Saunders, J. R., Gustafson, D. P., Jones, R. K. 1966. Pathologic findings in swine afecte with a virulent strains of Aujeszky's virus. Path. Vet. 3:64-82.
97. Otto, H. S., Clarence, M. F. 1983. El Manual Merck de veterinaria. 2a. edición. Merck and Company, Inc., Rarway, N. J. U.S.A.
98. Paz de V.O., cuevas, R. S., Morales, R. J., Durón, J., Padreira, M. 1986. Epizootiología de la enfermedad de Aujeszky en siete municipios del Estado de Jalisco. Reunión de investigación Pecuaria en México.

99. Pensaert, M., Maes, L., Andries, K. 1982. Aujeszky's disease: current situation in Belgium. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann, S. A. Hall (eds). Luxembourg.
100. Pensaert, M. B. and Kluge, J. P. 1989. Pseudorabies virus (Aujeszky's disease). In: virus infections of porcines. Edited by: Pensaert, M. B. 39-64.
101. Pijoan, A. C. 1982. Diagnóstico de las enfermedades del cerdo. México. 419-429.
102. Pijoan, C. and Ochoa, G. 1978. Interaction between a hog cholera vaccine strain and *Pasteurella multocida* in the production of porcine pneumoniae. J. Comp. Path. 88:167-170.
103. Pijoan, C. 1982. *Haemophilus pleuropneumoniae*. Mod. Vet. Prac. 63:645-653.
104. Pijoan, C. et al. 1983. Dilution technique for *Haemophilus* from swine lungs collected at slaughter. J. Clin. Microbiol.
105. Pijoan, C. 1984. *Haemophilus* update. Proc. Ann. conf. Swine herd. Health Programming. 101a.
106. Pijoan, C., Morrison, R. B. 1983. *Haemophilus pleuropneumoniae*. Proc. ann. Conf. Swine herd Health. Programming. 199-206.
107. Pittler, H. 1982. The occurrence and control of aujeszky's disease in the Federal Republic of Germany. In Aujeszky's disease. G. Wittmann, S. A. Hall (Eds.), Luxembourg.
108. Pohl, S., Bertschinger, H. V., Frederish, W. and Mannheim, W. 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int. J. Syst. Bact. 33:510-514.
109. Pol, J. M., Gielkens, A. J. 1989. comparative pathogenesis of three stains of pseudorabies virus in pigs. Microbial Pathogenesis. 7L361-371.
110. Power, S. B. et al. 1983. Porcine pleuropneumoniae associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 3 in the Republic of Ireland. Vet. Rec. 113:113-114.
111. Rock, D. L., Hagemoser, W. A., Osorio, F. A., McAllister, H. A. 1988. Transcription from the pseudorabies virus genome during latent infection. Arch. Virol. 98:99-106.
112. Rosendal, S. et al. 1985. Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria. Canad. J. comp. Med. 49:68-74.
113. Rosendal, S., Mitchell, W. R. 1982. Factors associated with spread and effect of pleuropneumoniae. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. México. 77.
114. Rosendal, S., Mitchell, W. R. 1983. Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: A survey of Ontario pork producers, 1981. Can. J. Comp. Med. 47:1-5.

115. **Rzba, H. J., Mettenleiter, T. C., Ohliger, V., Wittmann, G.** 1986. Herpesvirus (pseudorabies virus) latency in swine: occurrence and physical state of viral DNA in neural tissue. *Virology*, **155**:600-613.
116. **Sabo, A.** 1969. Persistence of perorally administered virulent pseudorabies virus in the organism of non immune and immunized pigs. *acta virol. (Praha)*, **13**:269-277.
117. **Sabo, A., Grunet, Z.** 1971. Persistence of virulent pseudorabies virus in herds of vaccinated and non-vaccinated pigs. *acta. Virol. (Praha)* **15**:87-94.
118. **Sakano, T., Shibata, I., Samegai, Y., Taneda, A., Okada, M., Irisawa, T. and Sato, S.** 1993. Experimental pneumonia of pigs infected with ajeszky's disease virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.* **55**: 575-579.
119. **Sánchez, V. J. M., Alvarez, M.** 1987. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en Patología animal y Vegetal. Office International des epizootes-Instituto Nacional de Investigaciones agrarias. Paris. 1-35.
120. **Sanford, S. E., Josephson, G. K. A.** 1981. Porcine Haemophilus pleuropneumoniae epizootic in Southwestern Ontario: Clinical, Microbiological, Pathological and some epidemiological findings. *Canad. J. Comp. Med.* **45**:2-7.
121. **Sebunya, T. N. K., Sauder, J. R.** 1982. Haemophilus pleuropneumoniae infection in swine: A review. *JAVMA*, **182**:1331-1337.
122. **Shope, R. E.** 1964. Porcine contagious pleuropneumoniae. Y. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. Exp. Med.* **119**:359-368.
123. **Solorzano, B. S., Mercado, S. S.** 1985. Pruebas serológicas epizootológicas de Pseudorabia (Enfermedad de Aujeszky). *Porcira*. **30**-39.
124. **Straw, B. E., Burgl, J., Hilley, D.** 1983. Pneumonia and atropic rhinitis in pigs from a test station. *JAVMA*, **182**:607-611.
125. **Straw, B. E., Tuovinen, V. K., Briggs-Poulin, M.** 1989. Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. *JAVMA*, **195**: 1702-1706.
126. **Tabbs, R. C.** 1989. Managing the swine herd that's been infected with Haemophilus pleuropneumoniae. *Vet. Medicine. Food- Animal Practice.* **220**-229.
127. **Utrera, V., Pijoan, C.** 1991. Fimbriae in actinobacillus pleuropneumoniae strains isolates from pig respiratory tracts. *Vet. Record.* **128**:357.
128. **Van Oirschot, J. T., Gielkens, A. L.** 1984. Some characteristics of four attenuated vaccine virus strains and a virulent strains of Aujeszky's disease virus. *Vet. quarterly.* **6**:225-229.
129. **Vannier, P.** 1982. Efficacy of an inactivated virus vaccine against Aujeszky's disease for fattening pigs or without passive immunity. In: Aujeszky's disease, G. Wittmann. S. A. Hall (eds). Luxembourg.



130. Watt, R. G. 1978. Virological study of two commercial pig herds with respiratory disease. Res. Vet. Sci. 24:147-153.
131. Wilson, P. J., Osborne, A. D. 1984. Solid-phase-enzyme-linked immunoassay to detect type-specific swine antibodies against *Haemophilus pleuropneumoniae*. Canad. Vet. J. 25:111.
132. Yagihashi, T., Nunoya, Y., Mital, T. and Tajima, M. 1986. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on swine antibodies against *Haemophilus pleuropneumoniae*. Canad. Vet. J. 25:111.
133. Yates, W. D. G. 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral bacterial synergism in respiratory diseases of cattle. Can. Comp. Med. 46:225-263.