



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN LENTA EN TUBO Y
2-MERCAPTOETANOL CON SUERO DE CERDOS VACUNADOS
CONTRA *Actinobacillus pleuropneumoniae***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA GABRIELA CANTARELL GONZÁLEZ

**ASESORES: Dra. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
Dr. ABEL CIPRIÁN CARRASCO**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar y agradecer este trabajo:

A Dios, por darme la vida y permitirme llegar a este momento, le doy gracias por guiar mis pasos cada día, junto con mis padres.

A mis padres, porque con su cariño, a través de Dios han sido el instrumento que me a guiado, les doy gracias por haberme dado la fuerza para luchar cada día hasta lograr mis objetivos.

A mis hermanos, por estar conmigo cada día, dándome su apoyo incondicional.

A mi esposo, porque a pesar de los momentos difíciles, nunca dudo de mí, y siempre me impulso a continuar.

A mis hijos, que son dos ángeles que Dios ha puesto a mi lado, para alentarme con sus sonrisas.

A mis suegros y cuñados, por que nunca dejaron de creer en mí y me impulsaron a continuar hasta terminar.

A la doctora Susy, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto, y por su apoyo y paciencia durante el desarrollo del mismo.

Al doctor Abel, por su apoyo profesional durante la realización del trabajo.

A todos mis amigos, que de alguna manera contribuyeron con su cariño y apoyo, para llegara a este momento en mi vida.

ÍNDICE

| | Pág. |
|---|------|
| RESUMEN..... | I |
| CUADROS..... | II |
| FIGURAS..... | II |
| ABREVIATURAS..... | III |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Generalidades de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina..... | 1 |
| 1.2 Historia..... | 1 |
| 1.3 Características morfológicas y bioquímica de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | 2 |
| 1.4 Distribución geográfica..... | 3 |
| 1.5 Epidemiología..... | 3 |
| 1.6 Patogenia..... | 4 |
| 1.6.1 Factores de patogenicidad de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | 4 |
| 1.6.1.1 Cápsula..... | 4 |
| 1.6.1.2 Fimbrias citoadherente..... | 5 |
| 1.6.1.3 Lipopolisacárido..... | 6 |
| 1.6.1.4 Proteínas de membrana externa..... | 6 |
| 1.6.1.5 Exotoxinas..... | 7 |
| 1.6.1.6 Proteasas..... | 8 |
| 1.7 Signos clínicos..... | 9 |
| 1.8 Diagnóstico serológico de la PCP..... | 9 |
| 1.8.1 Prueba de fijación de complemento..... | 10 |

| | |
|---|----|
| 1.8.2 Reacciones de aglutinación..... | 10 |
| 1.8.3 Reacciones de coaglutinación en tarjeta..... | 12 |
| 1.8.4 Reacciones de aglutinación en tubo..... | 12 |
| 1.8.5 Reacción de aglutinación lenta en tubo..... | 13 |
| 1.8.6 Reacción de aglutinación en placa..... | 13 |
| 1.8.7 Pruebas de reducción de las uniones del disulfuro: 2 mercaptoetanol..... | 14 |
| 1.8.8 Prueba de ELISA..... | 14 |
| 1.9 Vacunación..... | 15 |
| 1.10 Justificación..... | 16 |
| 1.11 Hipótesis..... | 16 |
| 2. OBJETIVOS | |
| 2.1 Objetivo General..... | 17 |
| 2.2 Objetivos Particulares..... | 17 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 3.1 Sueros utilizados..... | 18 |
| 3.2 Preparación del estándar de antígeno..... | 18 |
| 3.3 Estandarización de las pruebas de aglutinación lenta en tubo y 2-mercaptoetanol en tubo y microplaca..... | 19 |
| 3.4 Prueba de aglutinación lenta en microplaca..... | 20 |
| 3.5 Prueba de 2-mercaptoetanol en microplaca..... | 20 |
| 3.6 Interpretación de las pruebas..... | 21 |
| 4. RESULTADOS | 22 |
| 5. DISCUSIÓN | 29 |
| 6. CONCLUSIONES | 31 |

7. REFERENCIAS.....

CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1: Resultados de las pruebas de aglutinación para antígeno de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1 (Log). | 26 |
| Cuadro 2: Resultados de las pruebas de aglutinación para antígeno de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 3 (Log). | 27 |

FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Reacción positiva de ALT..... | 21 |
| Figura 2: Reacción negativa de ALT..... | 22 |
| Figura 3: Falsos positivos..... | 22 |
| Figura 4: Grados de turbidez..... | 23 |
| Figura 5: Comparación de resultados..... | 23 |
| Figura 6: Resultados de aglutinación lenta en microplaca..... | 24 |
| Figura 7: Comparación de resultados en microplaca..... | 24 |
| Figura 8: Dinámica de Ac contra <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1..... | 26 |
| Figura 9: Dinámica de Ac contra <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 3..... | 28 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| Ac..... | Anticuerpo |
| Ag..... | Antígeno |
| Ig..... | Inmunoglobulina |
| 2-ME..... | 2-Mercaptoetanol |
| ALT..... | Aglutinación lenta en tubo |
| App..... | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> |
| PCP..... | Pleuroneumonía contagiosa porcina |
| LPS..... | Lipopolisacárido |
| μL..... | microlitros |
| min..... | minutos |
| SS..... | Solución salina |
| hrs..... | horas |
| mL..... | mililitros |
| NAD..... | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| SPF..... | Cerdos libre de patógenos específicos |
| CF..... | Fijación de complemento |

RESUMEN

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) es el agente etiológico de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP), cuando se ven afectados los cerdos, ocurren brotes de la neumonía que pueden causar pérdida, por la muerte de los cerdos, que cuando se recuperan desarrollan neumonía crónica, con una disminución en su tasa de crecimiento. En el presente diseño experimental, se trabajó con 100 sueros de cerdos vacunados con una sola dosis de una bacterina preparada con App serotipos 1 y 3, con procedencia de la granja de cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnista de la UNAM. Debido a que el diagnóstico serológico es una herramienta importante, por su rapidez y sensibilidad, se realizó la estandarización de dos técnicas, aglutinación lenta en tubo (ALT) y 2-mercaptoetanol (2-ME) específicamente para el antígeno de App1 y App3, las cuales se adaptaron de tubos a microplacas con 96 pocillos. Para la estandarización se utilizaron 12 sueros controles, 6 positivos para App 1 y App 3 y seis negativos a la bacteria App, las pruebas se hicieron por triplicado, se comparó los resultados para ver su reproducibilidad de las técnicas en tubo y microplaca. Los 100 sueros entregados por la granja, se encontraban divididos en 25 por muestreo, los muestreos se hicieron por semana sumando un total de 4 (información dada por el responsable de la granja). Los sueros se trabajaron con las técnicas de ALT y 2-mercaptoetanol en microplaca para evaluar la respuesta humoral que tuvieron después de que los cerdos se vacunaron con la bacterina propia de la granja. Los sueros dieron resultados positivos para Ac IgM que nos evalúa la respuesta primaria y dieron negativo para Ac IgG que nos evalúan la respuesta secundaria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*

En la actualidad las enfermedades respiratorias del cerdo, son un problema de salud animal importante, ya que afectan seriamente la producción porcina. En neumonía del cerdo, uno de los agentes primarios más importantes es considerado el *Actinobacillus pleuropneumoniae* que causa Pleuroneumonía Contagiosa Porcina. (PCP). (Mendoza. et. al., 2001). En función de sus requerimientos de nicotinamín adenosín dinucleótido (NAD), el *A. pleuropneumoniae* se clasifica en dos biotipos, el biotipo 1 agrupa las cepas dependientes de NAD, y dentro de él se han reconocido 12 serotipos. El biotipo 2 agrupa las cepas NAD independientes reconociéndose los serotipos 13 y 14. Recientes estudios muestran la identificación del serotipo 15 que se agrupa dentro del biotipo 1 ya que es dependiente de NAD. (Blackll. Et. al. 2002)

La PCP es una enfermedad devastadora, produce en los cerdos susceptibles una mortalidad alta y pérdidas económicas, debido a una pobre conversión alimenticia en los animales infectados crónicamente. La enfermedad puede variar desde un curso hiperagudo hasta el crónico, en donde la lesión aguda característica es una neumonía hemorrágica necrosante, asociada a una pleuritis fibrinosa y mientras que la lesión crónica se distingue por un tejido pulmonar consolidado, infartado y encapsulado. (Mendoza. et. al., 2001)

Para el diagnóstico oportuno de la PCP son de gran ayuda las técnicas serológicas de aglutinación. La serología puede revelar el origen y seguir la evolución de la experiencia inmunogénica con la aparición de anticuerpos de la clase IgM que señala el origen reciente de la infección. (Kumate, 1977).

1.2 HISTORIA

En 1963, Olander (en California, EUA) aisló una bacteria de cerdos con problemas neumónicos, la cual requería para su crecimiento el factor V (nicotiamin adenosin dinucleótido NAD) y producía una hemólisis marcada en el agar sangre por lo que se le denominó *Haemophilus parahemolyticus*. Ese mismo año Shope (en Argentina) investigó un brote de pleuroneumonía de tipo agudo en cerdos y se denominó *Haemophilus pleuropneumoniae*. Después de una serie de estudios a estas bacterias se llegó a la conclusión que ambas bacterias eran idénticas siendo más aceptado el nombre de *Haemophilus pleuropneumoniae*. (Shope, 1964)

En la actualidad en base a estudios de hibridación de DNA la bacteria *Haemophilus pleuropneumoniae* se ha reubicado en el género *Actinobacillus* denominándosele *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pohl. et. al., 1983). Por otro lado, en base a los requerimientos de NAD para su crecimiento se han definido dos biovariedades, la biovariedad 1 que requiere este factor y la biovariedad 2 que no lo requiere. (Schultz, 1982).

1.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

A. pleuropneumoniae es una bacteria Gram negativa y pleomórfica, generalmente se observa como un bacilo corto y encapsulado que mide de 0.5 a 1.5 μm de largo por 0.3 μm de ancho, es una bacteria que carece de flagelos y no produce esporas, sin embargo posee fimbrias citoadherentes, es una bacteria aerobia o anaerobia una característica fundamental de este microorganismo es la dependencia de NAD, factor de crecimiento conocido como V; no requiere de hemina, conocido como factor de crecimiento X presente en los medios enriquecidos con sangre (Mendoza. et. al., 2001). Por su necesidad del factor V crecen en la proximidad de colonias de *Staphylococcus aureus*, fenómeno que se conoce como crecimiento satélite o satelitismo. Fermenta la mayoría de los carbohidratos, excepto sorbitol, ducitol y meso-inositol, no utiliza los citratos, no produce ácido sulfhídrico, ni indol, degrada la urea y los nitratos, presenta reacción dudosa a la catalasa y oxidasa. (Nielsen, 1974)

La existencia de varios serotipos de esta bacteria fue determinada por los estudios de aglutinación cruzada de Nicolet en 1971, el cual definió tres serotipos basándose en los antígenos de tipo específicos asociados a la cápsula (lábiales y resistentes al calor). Esta clasificación fue ampliada por Gunnarson A. en 1977, quien descubrió los serotipos 4 y 5; y Nielsen, R (1974) y Rosendal., S., Boyd, D.A. (1982) quienes propusieron la existencia de los serotipos 6 y 7 respectivamente. En la actualidad se reconocen mundialmente 15 serotipos de esta bacteria. (Blackall. et. al., 2002)

1.4 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La PCP, está ampliamente distribuida en muchos países, en los cuales se han aislado, identificado y tipificado los diferentes serotipos de *A. pleuroneumoniae* (Mendoza, E. S., Ciprián C. A. 2001), en Dinamarca se han encontrado casi todos los serotipos de esta bacteria (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 y 12) prevaleciendo el serotipo 2; en algunos países como Argentina, Irlanda, Rumania, Taiwán y Venezuela han identificado sólo un serotipo (1, 8, 5 y 7) respectivamente, mientras que en otros países no se ha reportado ningún serotipo. (Maqueda, 1977)

En México a partir de 1976, se observaron epizootías severas de neumonía en granjas porcícolas del Bajío y del Estado de Tlaxcala. Estos se caracterizaron por la elevada morbilidad (80-90%) y mortalidad (10-30%), que inicialmente afectó a los cerdos adultos y con el tiempo se fue estableciendo como una infección enzoótica en los lechones. (Maqueda, 1977)

1.5 EPIDEMIOLOGÍA

Esta enfermedad se transmite por contacto directo, por medio de aerosoles de un cerdo portador a otro susceptible. También se pueden infectar de forma indirecta, por el mismo personal de la granja, por medio de la ropa, botas e instrumental contaminado (Mendoza. et. al., 2001). Después de que sucede un brote es frecuente descubrir que fueron adquiridos animales nuevos o que los ya existentes fueron movidos antes de la aparición de los primeros

signos del brote. Estos brotes también se han asociado con estrés, sobrepoblación, mala ventilación y alta húmeda. (Sanford, 1981, Piojanm. Morrison., 1983. Schultz., 1982)

1.6 PATOGENIA

La patogenia exacta de *A. pleuropneumoniae* es desconocida, sin embargo, se ha demostrado que se encuentran relacionados varios factores. Las investigaciones sugieren que la endotoxina es la responsable de los cambios patológicos iniciales y que las citolisinas son citotóxicas para los macrófagos alveolares, posteriormente los complejos antígeno-anticuerpo destruyen el endotelio vascular causando vasculitis y trombosis. Estos daños resultan en edema, infarto, necrosis, exaltación y hemorragia que son características de la PCP. (Dider. et. al., 1984., Piojan, 1982., Sanford. et. al., 1881)

El tamaño del inóculo y el lugar donde se implante son también importantes en la patogenia de la enfermedad ya que los aerosoles que contienen al microorganismo de tamaño pequeño penetran más profundo alcanzando niveles alveolares lo cual favorece la infección, cuando esto sucede los macrófagos alveolares son destruidos por la endotoxina y la enfermedad se manifiesta. Por otro lado se ha demostrado que sólo 100 células de *A. pleuropneumoniae* son capaces de causar lesiones severas en los animales susceptibles. (Piojan, 1982., Morrison, 1983., Rosendal. Mittal., 1985)

1.6.1 FACTORES DE PATOGENICIDAD

1.6.1.1. CÁPSULA

La cápsula es la responsable de la especificidad del serotipo de *A. pleuropneumoniae*, en la actualidad se reconocen 13 serotipos del biotipo 1 debido a la presencia del antígeno capsular. Los estudios sobre antígenos empleados para el diagnóstico serológico han demostrado que la cápsula es la más adecuada para tal propósito, debido a que la estructura química de esta macromolécula es única en cada uno de los serotipos, excepto en el serotipo 5 que se ha subdividido en serotipo 5a y 5b. (Olander, 1963)

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 pirogénica. (Nakai. Sawata., 1985)

Los anticuerpos generados contra la cápsula, sólo disminuyen la mortalidad, pero no evitan las lesiones pulmonares y la infección crónica. La virulencia atribuida a la cápsula es variable entre los diferentes serotipos, y aunque es requerida para que *A. pleuropneumoniae* sea patógeno, aún no se conoce por completo el papel patogénico de la cápsula. (Nakai. Sawata., 1985)

1.6.1.2 FIMBRIAS CITOADHERENTES

Se han identificado en *A. pleuropneumoniae* estructuras semejantes a fimbrias o pilis citoadherentes, denominados adhesinas. Sin embargo, no se han encontrado estos apéndices extracelulares en la bacteria cultivada *in vitro* por lo que al parecer sólo los expresa en el cerdo, estas se han identificado mediante microscopía electrónica y estudios de patogenicidad en cerdos libres de patógenos específicos, en donde *A. pleuropneumoniae* presenta estos factores de adherencia los cuales sólo se mantienen en los primeros pases de la bacteria en medios de cultivo *in vitro*. (Mittal. et. al., 1983)

Garibay y cols. en (1993) encontraron fimbrias de un diámetro de hasta 2 nm, no obstante que también encontraron fimbrias de 2 a 7 nm de diámetro, lo cual sugiere que *A. pleuropneumoniae* está expresando dos clases de estructuras fimbriales que ya se habían encontrado en *Escherichia coli*, una rígida que tiene un diámetro de 2 a 5 nm y que está involucrada en la conjugación y la otra “flexible” con diámetro de hasta 2 nm, involucrada únicamente en la adherencia, al igual que en el estudio anterior estas estructuras se fueron perdiendo en los pases subsecuentes. (Garibay. et. al., 1993)

1.6.1.3 LIPOPOLISACÁRIDO

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar una membrana externa, que estructuralmente es semejante a la membrana citoplasmática, sólo que en la membrana externa o envoltura celular se encuentra enclavado el Lipopolisacarido (LPS). (Gerrlach. G.F., Anderson. et. al., 1993).

La estructura del antígeno “O” es variable entre los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae* y se componen principalmente de glucosa, galactosa, ramnosa, azúcares aminados como la N-acetilglucosamina y la N-acetilgalactosamina. El antígeno “O” es el responsable de las reacciones cruzadas entre los serotipos 1, 9 y 11 porque comparten el antígeno “O:1”, el serotipo 2 el antígeno somático “O:2”; con respecto a los serotipos 3, 6, y 8 estos comparten el antígeno “O:3”; lo mismo sucede con el serotipo 4 que cruza con el 7 porque comparten el antígeno “O:4”; en el caso del serotipo 5 (5a y 5b), este posee el antígeno “O:5”; mientras que el serotipo 10 posee el antígeno “O:6” y el serotipo 12 el “O:7”. (Fenwick, 1990., Mittal. et. al., 1983)

Las propiedades biológicas del LPS se resumen en las siguientes actividades: tienen la actividad biológica clásica de una endotoxina de los Gram negativos; 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 un pirógeno. El LPS de los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae* induce una infiltración de células inflamatorias cuando se inocula a ratones y cerdos por vía respiratoria, observándose una neumonía intersticial multifocal y no la neumonía fibrinohemorrágica necrótica clásica de la PCP. (Ciprián. et. al., 1994)

1.6.1.4 PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME)

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 (Gerrlach. et. al., 1993). Todos los serotipos contienen varias proteínas comunes,

incluyendo la lipoproteína asociada al peptidoglicano llamada PalA, una proteína modificable por calor, además de una de 48 kDa que no está presente en otras especies gram-negativas, relacionada con la patogénesis del tracto respiratorio del cerdo. (Cruz. et. al., 1996). Las proteínas de la membrana externa de los serotipos 1 y 9 fueron idénticas por lo que estos serotipos presentan reacción cruzada por estos antígenos, así como los serotipos 2 y 6 aunque estos serotipos pueden diferenciarse por sus antígenos capsulares, los serotipos 3, 4, 5, 7 y 8 presentan perfiles diferentes, estos serotipos sólo cruzan por sus antígenos somáticos de la siguiente manera: el 3f con el 8, el 4 con el 7, el 5 no cruza con los demás (Fenwick, 1990). Las PME son importantes en la regulación de proteínas superficiales en respuesta a las condiciones de crecimiento, además de que estas proteínas son capaces de inducir cierta respuesta inmune. (Haesebrouk. et. al., 1997)

1.6.1.5 EXOTOXINAS

Las exotoxinas bacterianas son proteínas extracelulares solubles, que al ser liberadas al medio por el organismo vivo, se activan bioquímicamente (Enríque-Verdugo, I., Guerrero-Barrera., et. al. 2002). Se han identificado cuatro tipos de citotoxinas en *A. pleuropneumoniae*, las cuales son llamadas toxinas Apx, que pertenecen a la familia de las toxinas RTX formadoras de poros.(Frey, 1995)

- Apx I: Proteína de 105 kDa, fuertemente hemolítica y fuertemente citotóxica. Es codificada por el operón *apxI*, que tiene 4 genes: *apxIC* (activador), *apxIA* (pretoxina) y *apxIB* y *apxID* (aparato de secreción). La proteína ApxI la produce los serotipos 1, 5a, 5b, 9, 10 y 11 y por lo tanto son los más virulentos.
- Apx II: Proteína de 103-105 kDa, débilmente hemolítica y citotóxica es codificada por el operón *apxII* y consiste de 2 genes: *apxIIC* y *apxIIA*, utiliza los productos de los genes *apxIB* y *apxID* para secretarse, la producen todos los serotipos excepto el 10.

- Apx III: Proteína de 120 kDa, es no hemolítica y fuertemente citotóxica, codificada por el operón apxIII y contiene 4 genes: *apxIIIC*, *apxIIIA*, *apxIIIB* y *apxIIID*. ApxIII la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8.
- Apx IV: Recientemente descrita en *A. pleuropneumoniae*, tienen actividad citotóxica y la producen todos los serotipos, además de que son específicas del serotipo. (Cho, W.S. and Chae., 2001.)

La actividad hemolítica de estas proteínas es probablemente la responsable de las lesiones iniciales de la pleuroneumonía porcina, caracterizadas por ser hemorrágicas y necrosantes. Las toxinas Apx son el principal factor de virulencia y en su ausencia la cepa de *A. pleuropneumoniae* es avirulenta. (Frey, 1995)

1.6.1.6 PROTEASAS

Las proteasas de microorganismos son factores de virulencia, ya que hidrolizan componentes proteicos del huésped y facilitan su invasión. *A. pleuropneumoniae* secreta enzimas proteolíticas hacia el medio de cultivo y éstas tienen actividad sobre varios sustratos como son la gelatina, hemoglobina e IgA porcinas. Las proteasas son probablemente inactivas cuando están dentro de la célula y se activan cuando están dentro de la célula y se activan cuando se secretan, deduciéndose que podría facilitar la invasión de la bacteria a las mucosas del tracto respiratorio del cerdo. (García-Cuellar. et. al., 1995., Negrete. et. al., 1994)

Las proteasas de esta bacteria patógena son metaloproteasas neutras y se proponen como un factor de virulencia, ya que pueden facilitar la colonización de este microorganismo (Negrete. et. al., 1994). Una proteasa de alto peso molecular fue purificada de sobrenadantes de cultivo y caracterizada bioquímicamente. Anticuerpos contra esta proteasa reconocen a todos los serotipos de *A. Pleuropneumoniae* (Negrete. et. al., 1998). Recientemente se clonó y caracterizó un fragmento del gen que codifica para la metaloproteasa, el cual híbrida con todos los serotipos de *A. Pleuropneumoniae*, pero no híbrida con bacterias relacionadas de la familia *Pasterellaceae*. (García-Cuellar. et. al., 2000)

1.7 SIGNOS CLÍNICOS

La muerte súbita de los cerdos sin signos clínicos o lesiones externas es muy común en los casos hiperagudos en las infecciones por *A. pleuropneumoniae*, la muerte súbita ocurre generalmente en cerdos en buenas condiciones. Cuando los cerdos desarrollan inicialmente problemas respiratorios con *A. pleuropneumoniae*, empiezan a volverse lentos y letárgicos. Los animales generalmente presentan fiebre y las temperaturas varían de 104-105°F, pueden entonces presentar tos ligera y a medida de que se infectan más con la enfermedad, empeora la tos, empiezan a jadear, adelgazan y no quieren moverse. Muchas veces, se paran, estirando la cabeza, respirando rápidamente. Pueden encontrarse a los animales muertos, con sangre drenándose de la nariz. (Thomas, 1990)

1.8 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA PCP

El control exitoso de la de la pleuroneumonía porcina depende de un diagnóstico adecuado, efectuado a tiempo. Mientras que reconocer la forma aguda de la enfermedad es relativamente fácil. El diagnóstico de las infecciones subclínicas y la identificación de los portadores es más difícil. (Fenwick, 1990)

Las pruebas serológicas desempeñan un papel principal para controlar la diseminación de *A. pleuropneumoniae*, debido a que los animales portadores sanos son de importancia en la transmisión de la enfermedad entre hatos. Mientras que se han desarrollado muchas pruebas serológicas, la mayoría de ellas no han sido evaluadas completamente y se desconoce su sensibilidad, especificidad e índices de predicción. (Nielsen. et. al., 1977)

1.8.1 PRUEBA DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

El aislamiento exitoso de *A. pleuropneumoniae* de cerdos libres de enfermedades y lesiones es difícil utilizando los medios convencionales de cultivo y no es un indicador confiable de una exposición previa o de estado portador. Sin embargo, Kumate y Nakai reportan un grado no característico de éxito en el aislamiento de *A. pleuropneumoniae* de las

narices de los cerdos positivos en fijación de complemento (CF). La prueba fijación de complemento es el ensayo estándar usado en los Estados Unidos para comprobar cerdos en cuanto a anticuerpos de *A. pleuropneumoniae* (Hoffman, 1989). La prueba de fijación de complemento CF sirve como la “Norma de Oro” por la cual se han juzgado otras pruebas. Sin embargo, la actividad pro-complementaria o anti-complementaria de algunos sueros porcinos, interfiere con el uso de la prueba CF en algunos animales. La mala relación entre el título CF y la protección indica que el ensayo no depende de la infección, que confiere una inmunidad fuerte, y que no detecta la inmunidad en relación a un factor virulento importante. La vacunación puede inducir títulos CF positivos, pero puede no proporcionar protección significativa. Los resultados CF pueden ser difíciles de interpretarse, particularmente al tratar de identificar animales infectados crónicamente que pueden presentar un título bajo. (Hoffman, 1989)

1.8.2 REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

Las pruebas de aglutinación parecen ser tan sensibles como la prueba de CF, pero son mucho más sencillas. (Mitall. et. al., 1984.) Se han desarrollado otras pruebas serológicas para identificar a los cerdos que han padecido infecciones subclínicas por *A. pleuropneumoniae*, algunas de ellas serán descritas a continuación:

Las pruebas de aglutinación parecen ser tan sensibles como la prueba de CF, pero son mucho más sencillas. (Mitall. et. al., 1984.) La reacción de aglutinación es la consecuencia directa de la fijación del anticuerpo aglutinante sobre la célula. Se puede llevar a cabo fácilmente con bacterias como *A. pleuropneumoniae*. Las técnicas de aglutinación utilizadas en serología son de tipo semicuantitativo y consisten en incubar diluciones variables de antisuero en presencia de una concentración determinada de células bacterianas o de partículas de látex, ya sea en tubo o sobre una laminilla. La mezcla se incuba a 4 ° ó a 37 °C durante un tiempo variable (de 5 a 60 min.) y se agita. La aglutinación se lee macroscópicamente. La lectura macroscópica estudia el aspecto de la masa sedimentada en el tubo o en la placa, que es limitada y de bordes nítidos cuando se trata de una reacción negativa y más extensa con bordes irregulares si ésta es positiva. (Bach, Jean-Francois, et. al. 1984)

El título de aglutinación se define como la mayor dilución en la que se da lugar a una reacción positiva. Este título se evalúa con un margen de una dilución e indica en forma semicuantitativa la cantidad de anticuerpos presentes. (Bach. et. al., 1984)

Los anticuerpos aglutinantes son anticuerpos que aglutinan las células en una solución de cloruro de sodio 0.15 M. Depende: 1) de la estructura molecular (IgG o IgM) y por tanto de su valencia, 2) de la densidad de los receptores antigénicos en la superficie de las células y 3) del propio medio (fuerza iónica). La sensibilidad del antígeno puede alterarse variando significativamente la concentración salina. El pH del diluyente se ajusta ordinariamente a 7.0-7.2, pero la aglutinación no se altera entre pH que varíe de 5.0 a 8.5. (Merchan. et. al., 1970). Los anticuerpos aglutinantes son IgM y los no aglutinantes IgG, pero hay anticuerpos IgG aglutinantes. Los anticuerpos no aglutinantes pueden ponerse en evidencia mediante técnicas de aglutinación artificial (pruebas de Coombs, tratamientos enzimáticos de los eritrocitos, centrifugación, adición de solutos macromoleculares). (Bach. et. al., 1984)

PLEUROTTEST (Marca registrada por la UNAM) es una prueba de aglutinación en placa (PAP) destinada para identificar directamente los anticuerpos capsulares de *A. pleuropneumoniae* a partir del suero de cerdos de cualquier edad. PLEUOREST PAP esta diseñado para diagnóstico *in vitro*. (Ciprián,. et. al., 1990)

La prueba de PLEUROTTEST PAP se basa en el principio de aglutinación directa. El suero de cerdo a probar es mezclado con el reactivo que contiene células completas de *A. pleuropneumoniae* teñidas. En el caso de un cerdo infectado con PCP, su suero contiene anticuerpos específicos que reaccionan con los antígenos presentes en el reactivo produciendo una aglutinación, caracterizada 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 *A. pleuropneumoniae* ó si se trata de un cerdo vacunado contra PCP, el suero contiene otra clase de anticuerpos que no reaccionan con el reactivo, de tal forma que la aglutinación no se produce y no se observan grumos, indicando un resultado negativo. (Ciprián. et. al., 1990)

1.8.3 ENSAYOS DE COAGLUTINACIÓN EN TARJETA

En la Facultad de Estudios superiores Cuautitlán UNAM, se ha desarrollado un ensayo de coaglutinación en tarjeta para el diagnóstico de la PCP (Aguilera y cols.1989). Esta prueba se desarrolla a partir de una cepa de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 y otra cepa de *Staphylococcus aureus* cepa HG-14. Ambos antígenos se tiñen por separado con rosa de bengala y se suspenden en un amortiguador de lactato a una concentración final dada. Para la prueba se colocan 30 mcl de suero de cerdo en el pozo de una placa de porcelana blanca excavada, los cuales se mezclaron por un volumen igual del reactivo de estafilococos, agitando por rotación lenta durante 4 minutos. Si no se presenta la aglutinación, se agregaban 30 mcl del reactivo de *Actinobacillus* y se agita 4 minutos más, se considera positivo todo grado de aglutinación comparado con un control negativo, en el que el suero se intercambié por amortiguador salino de fosfatos, y un control positivo en el que se utilizó un suero hiperinmune, desarrollado en conejo contra el cuerpo bacteriano intacto, de la cepa *Actinobacillus* utilizada en la preparación del reactivo. (Ciprián. et. al., 1990)

1.8.4 REACCIONES DE AGLUTINACIÓN EN TUBO

Se suspende una cantidad determinada de antígeno de *A. pleuropneumoniae* en suero fisiológico, a fin de conseguir una densidad tipo. Generalmente se incorpora al diluyente fenol 0.5% y formalina al 0.2%, para evitar el desarrollo de gérmenes contaminantes durante la incubación de la reacción. Las suspensiones bacterianas se ajustan a una densidad tipo, basándose en el volúmenes bacterianos sedimentados, en relación con el diluyente empleado. Los métodos turbidimétricos también se emplean corrientemente para ajustar la densidad de los antígenos. (Merchan. et. al., 1970)

Para realizar la reacción se pone el suero de cerdo sin diluir en un tubo de ensayo, midiendo directamente las cantidades con una pipeta, o bien se preparan previamente diluciones en suero fisiológico o en una solución bufferada o amortiguadora. Seguidamente se añade un cantidad fija de antígeno y ambos líquidos se mezclan. En ciertas técnicas se emplea el antígeno como diluyente del suero. Después de mezclados el antígeno y las diversas

diluciones de suero, se incuban durante un período de tiempo determinado (24 a 48 hrs.) a 37 °C. Si se produce la aglutinación, los grumos se van depositando en el fondo del tubo por gravedad y la parte superior del líquido queda bastante clara. Si el resultado es negativo, el antígeno permanece uniformemente turbio. (Merchan. et. al., 1970)

1.8.5 REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN LENTA EN TUBO

La prueba de aglutinación lenta es una prueba individual usada por los programas de control y erradicación de enfermedades en diferentes países. Esta prueba presenta limitantes tales como no poder diferenciar anticuerpos vacunales (cepa 19 en brucella) de aquellos producidos por una infección natural; tampoco permite detectar con exactitud anticuerpos de infecciones recientes o estados de cronicidad y además tiene la desventaja de que algunas veces da reacciones cruzadas con anticuerpos de otros microorganismos (NADL, 1965 Cortés y Cabello, 1970; Morgan y cols. 1971). En esta prueba intervienen tres componentes principales, que son: el suero problema, el antígeno y la solución salina. (Alton. et. al., 1975)

1.8.6 REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN EN MICROPLACA.

Una técnica que proporciona las reacciones de aglutinación más rápidas es la realizada en microplaca. Se emplean suspensiones concentradas de antígeno de *A. pleuropneumoniae* o de alguna otra bacteria. Para facilitar la lectura de los resultados, frecuentemente se emplean antígenos coloreados. Para ello se aplican el cristal violeta, el violeta de metilo y el verde de malaquita. (Merchan. et. al., 1970)

1.8.7 PRUEBAS DE REDUCCIÓN DE LAS UNIONES DEL DISULFURO: 2 MERCAPTOETANOL.

Generalmente un estímulo antigénico inicia la producción de inmunoglobulinas en forma difásica, con una producción inicial de IgM seguida de IgG. Cuando los cerdos son vacunados con bacterinas completas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12), ocurre la misma secuencia de producción de Ac.; sin embargo, los

niveles de IgG disminuyen mucho más pronto que en los niveles de IgM. En infecciones crónicas, los niveles de IgG son mucho más altos que los de IgM o bien pueden estar solo las IgG. La IgM (pentámero) se puede romper cuando se reducen los puentes del disulfuro con Mercaptoetanol (Anderson y cols., 1964) cisteína o ditiotreitól (Morgan y cols. 1971) y por lo tanto, la molécula pierde su actividad de anticuerpo. La IgG es resistente a este tratamiento cuando se usan las diluciones correctas del reductor. (Alton. et. al., 1975)

Esta prueba funciona como evidencia presuntiva en cuanto a la presencia de IgG comparando los títulos del mismo suero antes y después del tratamiento con el reductor. (Alton. et. al.,1975)

1.8.8 PRUEBA DE ELISA

La técnica de ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su nombre en ingles (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay). Como todo ensayo inmunoenzimático, la prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos ó anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos. (Info@labgemenis.com)

De un modo general se procede a la fijación de uno de los componentes de la reacción inmunológica (antígeno de *A. pleuropneumoniae*) a un soporte sólido, poniendo luego en contacto con una fase fluida, que contiene el reactivo complementario (suero del cerdo con anticuerpo contra *A. pleuropneumoniae*). El complejo inmunológico formado es enfrentado luego a las moléculas capaces de reconocer a su componente más superficial, marcadas con una enzima (peroxidasa de rábano picante), agregándose posteriormente un sustrato cromogénico de la enzima marcadora. La existencia de un antígeno ó anticuerpo se prueba con la utilización de un estándar ó calibrador. (Info@labgemenis.com)

1.9 VACUNACIÓN

El uso de bacterinas inactivadas se llevó cabo al poco tiempo de haberse identificado el agente causal de la enfermedad. En México, por ejemplo, producimos muchas dosis de vacuna *A. pleuropneumoniae* al año siguiente de haberse diagnosticado la enfermedad (Piojan. et. al., 1978). Posteriormente se demostró que dichas bacterinas en adyuvantes de gel (hidróxido de aluminio) eran muy poco eficaces, protegiendo sólo contra la muerte pero no contra la infección (Piojan. et. al., 1982 y Ortiz. et. al, 1980). Al mismo tiempo, Nielsen en Dinamarca encontró similarmente que las vacunas en gel no protegían contra la infección mientras que las de adyuvantes oleoso protegían mejor (Nielsen, 1979 y 1984). Nielsen, también demostró que las vacunas inactivadas no conferían ninguna protección cruzada entre serotipos, mientras que los animales que se recuperaban de la infección natural tenían una sólida inmunidad contra todos los serotipos (Nielsen, 1985). Más tarde Henry (1982) realizó un estudio de la viabilidad económica de una vacuna inactivada en gel, en una granja de engorda. Bajo estas condiciones encontró que los beneficios obtenidos no justificaban el costo de vacunación.

1.10 JUSTIFICACIÓN

El cerdo es la única especie que en forma natural es susceptible a *A. pleuropneumoniae* causándole una PCP sobreaguda, aguda y crónica. La morbilidad se puede presentar hasta en un 100%, con una mortalidad variable desde el 20% hasta un 80%. La mortalidad se presenta en cerdos de 4 semanas sin embargo, las pérdidas por muerte se encuentran limitadas en cerdos de 13 a 16 semanas de edad, por ello es importante el diagnóstico oportuno y rápido de la enfermedad así como su prevención a través de la vacunación, para lo que se están desarrollando vacunas con bacterinas y vacunas vivas atenuadas.

Para la evaluación de un perfil serológico en una vacuna, es necesario realizar distintas pruebas, esto hace que sea un proceso tardado y costoso, por eso se pretende reducir el tiempo y gasto económico llevando a cabo la estandarización de dos técnicas: la técnica de aglutinación lenta en tubo y 2-mercaptoetanol, que en la actualidad, se llevan a cabo principalmente para brucella, pero en este proyecto se estandarizaron en tubo y microplacas para la bacteria *A. pleuropneumoniae* serotipos 1 y 3 específicamente.

En el presente trabajó se evaluaron los sueros de cerdos vacunados con una bacterina propia de una granja de la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnista de la UNAM en Jilotepec, con la finalidad de saber si las técnicas son suficientemente sensibles para detectar si los cerdos desarrollaron inmunidad o no, para apoyar en el estudio de perfiles serológicos para el control y en un futuro la erradicación de la PCP.

1.11 HIPÓTESIS

Si la estandarización de las técnicas de aglutinación lenta en tubo y 2-mercaptoetanol es efectiva, entonces ambas técnicas nos servirán como apoyo en el estudio de perfiles serológicos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Estandarizar las técnicas de aglutinación lenta en tubo y prueba de reducción de las uniones disulfuro 2-Mercaptoetanol en tubo y microplaca para evaluar los sueros de cerdos vacunados con una bacterina contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

2.2.1 Comparar la sensibilidad de las técnicas de aglutinación lenta en tubo y la prueba de reducción de las uniones disulfuro con 2-Mercaptoetanol, en tubo y microplaca con suero de cerdos vacunados con una bacterina contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

2.2.2 Evaluar el perfil serológico de suero de cerdos vacunados con una bacterina contra el agente bacteriano *Actinobacillus pleuropneumoniae* con las técnicas de aglutinación lenta y prueba de reducción de las uniones disulfuro 2-Mercaptoetanol.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 SUEROS UTILIZADOS

Se nos entregaron 100 sueros de cerdos vacunados con una bacterina con procedencia de la granja de cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnista (FMVZ) de la UNAM, ubicada en Jilotepec Estado de México. Los cerdos recibieron una sola dosis de la bacterina utilizada por la granja, la cual se preparó con *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) serotipos 1 y 3 (información dada por el responsable de la granja). Se utilizaron 12 sueros control en las pruebas de estandarización de las técnicas de Aglutinación lenta en tubo (ALT) y 2-mercaptoetanol, 6 positivos a la bacteria App serotipos 1 y 3, los otros 6 negativos a la bacteria (suero de cerdos sin inocular). Los otros 100 sueros se dividieron en los cuatro muestreos (sangrados) realizados por la granja, los muestreos se hicieron por semana, cada uno integrado por 25 sueros y fueron evaluados por cada una de las técnicas, en microplacas con 96 pocillos.

3.2 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE ANTÍGENO

Para la obtención de la biomasa de la bacteria pura, se utilizó agar BHI con una cepa madre de *Staphylococcus aureus* Cowan 1, ésta proporciona el factor V necesario para el crecimiento de *A. pleuropneumoniae*. También se utilizó agar sangre ya que nos proporcionó el factor V en el mismo medio, por lo que no fue necesario la utilización de ninguna cepa madre. Se toma una cepa estándar de referencia ATCC (American Time Cell Culture) de *A. pleuropneumoniae* seleccionando los serotipos 1 y 3, se siembra masivo en cajas separadas cada uno y se incubó a 37°C por 48 hrs. Una vez que crece la bacteria, se siembra nuevamente, cada serotipo en cajas diferentes, esta vez sólo en medio BHI + extracto de levadura a 37°C y por 48hrs.

Posteriormente, se cosecha la bacteria y se pasa a un matraz en 100 mL de medio BHI + extracto de levadura al 10 %, y se incubó a 37°C aprox. por 48 hrs. hasta obtener suficiente biomasa.

Se realizó una tinción de Gram para verificar la ausencia de contaminación en la biomasa, una vez probada la ausencia de contaminantes se inactivó con formaldehído al 0.5% durante 15 a 20 minutos, enseguida se centrifugó a 6000 rpm por 30 minutos para la obtención del antígeno (paquete celular), se lavó con SS fisiológica 3 o más veces según fue necesario hasta que el sobrenadante quedó transparente. Para la técnica de Mercaptoetanol se tomaron 2 mL de la biomasa y se adicionaron 100 mL de SS fisiológica y para la técnica de ALT, se tomaron 2 mL de la biomasa y se adicionaron 100 mL de SS fenolada..

La biomasa fue ajustada al 4.5% en tubos de ensayo. Para su ajuste se toma con un capilar una cantidad de la biomasa obtenida, y se pone en la microcentrífuga para determinar a que concentración se encuentra, de esta manera y utilizando la fórmula ($\text{Volumen 1 Concentración 1} = \text{Volumen 2 Concentración 2}$), donde se conoce el volumen 1 (volumen inicial), la concentración 1 (concentración dada por la microcentrífuga) y la concentración 2 (concentración deseada) , en base a lo cual se hace el cálculo para determinar el volumen sobrante o faltante de SS fenolada en el caso de ALT, y SS fisiológica en el caso de 2-mercaptoetanol, para tener la concentración deseada.

3.3 ESTANDARIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN LENTA Y 2-MERCAPTOETANOL EN TUBO Y MICROPLACA

Ambas técnicas se llevaron a cabo en tubo y placa simultáneamente, además se realizaron por triplicado, para verificar que los resultados fueran iguales en ambos casos, las pruebas se realizaron de la siguiente manera:

Se utilizaron 12 sueros control, 6 positivos y 6 negativos. Se preparó una serie de tubos para cada antígeno y simultáneamente se prepararon placas con 96 pocillos también para cada

antígeno. Se utilizó el método de la doble dilución para ambas pruebas. Para los tubos se toma 0.2 mL de suero de cerdo + 1.8 mL de SS fenolada o 2-mercaptoetanol y para las placas se colocan 20 μ L de suero de cerdo + 180 μ L de SS fenolada o 2-mercaptoetanol en el primer pocillo, a partir de ésta se hicieron diluciones dobles (1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/360), a cada dilución se le agregó 1mL ó 100 μ L (según sea el caso) de biomasa ajustada App 1 ó App3, se cubrió cada tubo y cada microplaca con papel micropor y se dejó incubando de 12 a 48 hrs. a 37°C. Posteriormente se hizo la lectura.

3.4 PRUEBA DE AGLUTINACIÓN LENTA EN MICROPLACA

Para la realización de esta prueba se llevó a cabo el método de la doble dilución como se describe a continuación:

Se preparó una microplaca con 96 pocillos para cada antígeno. En el primer pocillo se colocaron 20 μ L de suero de cerdo + 180 μ L de SS fenolada, a partir de esta se hicieron diluciones dobles (1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/360), a cada dilución se les agregó 100 μ L de la biomasa ajustada App1 ó App3, se cubrió la microplaca con papel micropor y se dejó incubar a 37°C de 12 hasta 48 hrs. Posteriormente se hizo la lectura.

3.5 PRUEBA DE 2-MERCAPTOETANOL EN MICROPLACA

Se llevó a cabo la técnica de la doble dilución como se describe a continuación:

Se preparó una microplaca con 96 pocillos para cada antígeno. En el primer pocillo se colocaron 20 μ L de suero de cerdo + 180 μ L de 2-mercaptoetanol, a partir de ésta se hicieron diluciones dobles (1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/360), y se incubó por 1 hr. aproximadamente en baño maría antes de agregar las biomasas App1 y App3, a cada dilución se les agregó 100 μ L de la biomasa ajustada App1 y App3, se cubrió la microplaca y se dejó incubar a 37°C de 12 hasta 48 hrs. Posteriormente se hizo la lectura.

3.6 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se consideran reacciones positivas, en cualquier dilución donde haya algún grado de aglutinación. La interpretación de las pruebas va a depender de qué tan efectiva fue la vacuna para los animales. Para el diagnóstico de infecciones bacterianas se establecen ciertos títulos de Ac como significativos, por lo que reacciones a bajas diluciones carecen de significación, en este caso se consideró que a partir de la dilución 1/40 es donde hay mejor respuesta en los resultados de los sueros y son las que nos pueden indicar presencia de infección.

4. RESULTADOS

Para la estandarización de las técnicas de ALT y 2-mercaptoetanol, primero se utilizaron 6 sueros positivos y 6 sueros negativos para *A. pleuropneumoniae* serotipos 1 y 3, se realizaron las técnicas en tubo y microplacas simultáneamente para comparar los resultados. Los resultados en los tubos se observó de la siguiente manera:

Un resultado es positivo cuando hay una aglutinación, esta se puede apreciar como una formación de grumos, así se puede observar en la figura 1:



Figura 1.
Reacción positiva de ALT

Un resultado es negativo cuando no hay formación de red o aglutinación, por lo que no hay turbidez, sino por el contrario se puede ver una solución transparente como se muestra en la figura 2.

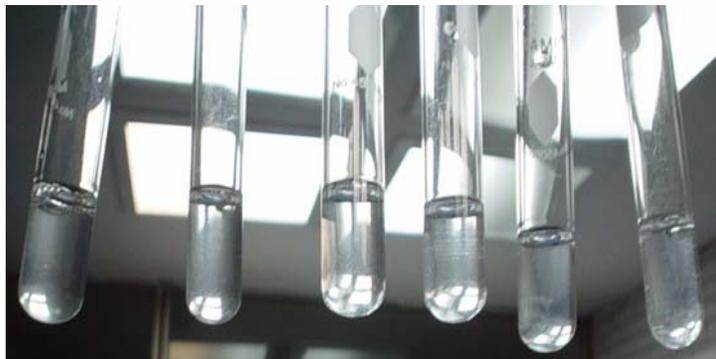


Figura 2.
Reacción negativa de ALT

La solución se ve transparente porque no hay ninguna reacción entre Ag y Ac, por lo tanto no hay formación de red y se forma una especie de botón en el fondo del tubo quedando el líquido transparente.

En algunas ocasiones se pueden interpretar falsos positivos, que se pueden ver como una sedimentación en el fondo, pero además vemos una ligera turbidez (Figura 3), esta turbidez no significa que sea positivo, simplemente es falta de tiempo para la sedimentación, es por ello que cuando se va a hacer la lectura se debe tener cuidado de no agitar demasiado los tubos para no crear este tipo de confusiones.

Se debe tomar como resultado positivo cuando no hay formación de botón, y se aprecia una turbidez, pero la turbidez puede ser mayor o menor, por lo que se puede representar con un signo “+” para los tubos con turbidez menor y anotando dos ó más veces el signo para tubos con una turbidez mayor (figura 4). Esto nos indica si hay una mayor o menor concentración de anticuerpos, y por lo tanto ver la intensidad de la respuesta inmunológica.

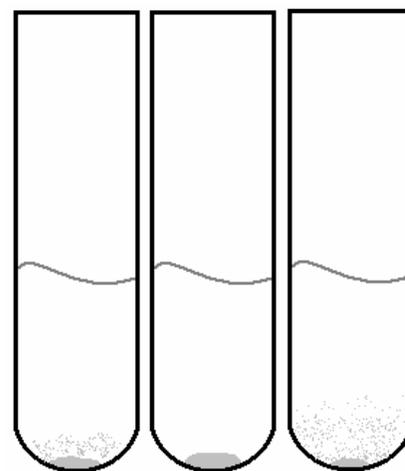


Figura 3.
Falsos positivos.

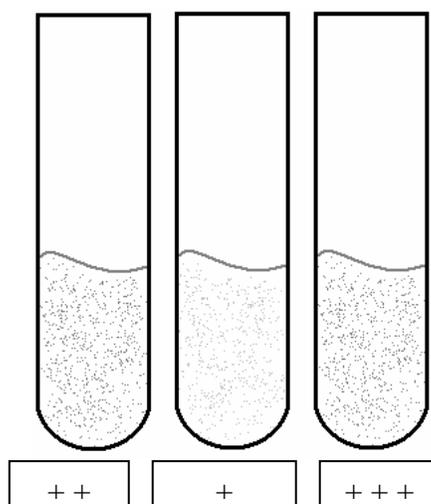


Figura 4.
Grados de turbidez



Figura 5.
Comparación de resultados.

En la figura 5 se hace la comparación de un resultado negativo (tubo izquierdo), con uno positivo (tubo derecho).

Con la finalidad de agilizar los resultados, se realizaron simultáneamente las técnicas de aglutinación en microplacas, con los mismos sueros utilizados para la aglutinación en tubo y los resultados se observan en la figura 6.

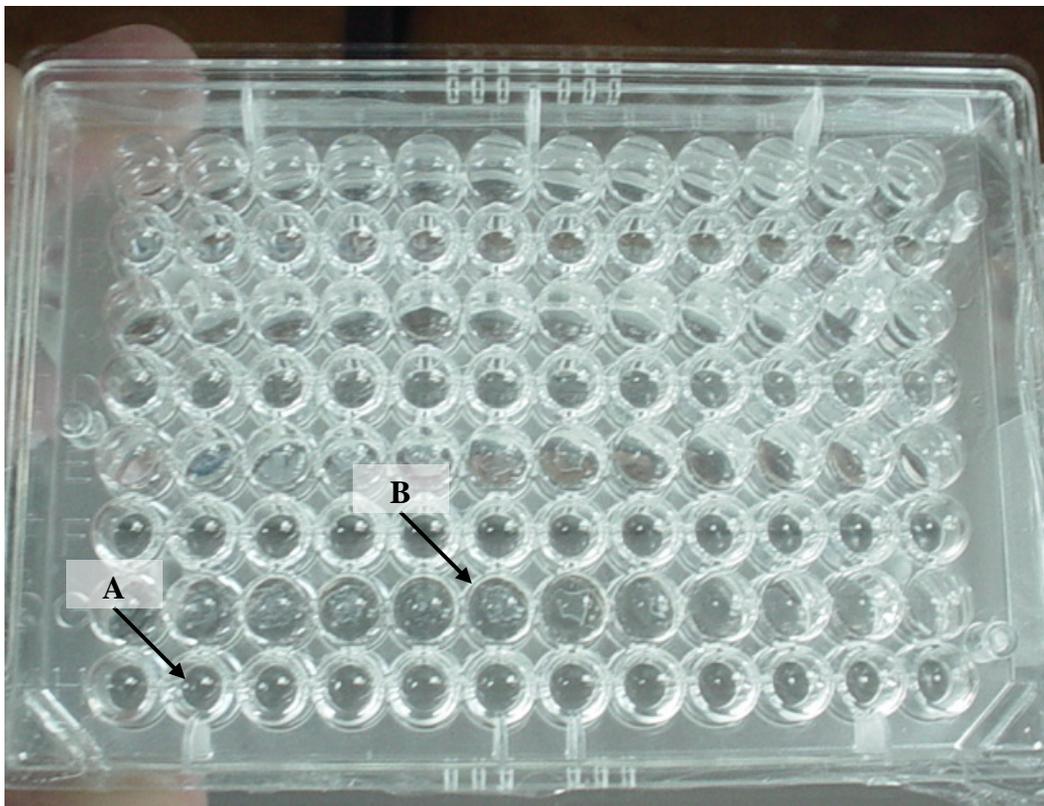


Figura 6. Resultados de aglutinación lenta en microplaca.

En la microplaca la lectura se hace de manera similar al tubo, pero en este caso se dice que el resultado es positivo, cuando hay una formación de red en la base del pocillo (figura 6, B), y se dice que es negativo cuando se observa un botón en el fondo (figura 6, A).

Para poder observar más claramente los resultados se colocaron juntos los pocillos, donde el pocillo B es positivo y el A negativo (figura 7).

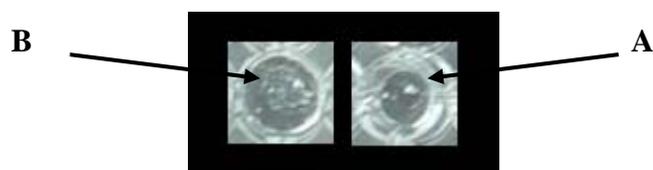


Figura 7.
Comparación de resultados en
microplaca.

Se realizaron cuatro sangrados para evaluar la respuesta serológica.

Los resultados obtenidos con el antígeno del serotipo 1, mostraron que en el primer muestreo no se encontraron títulos tanto con las pruebas de ALT como con 2-mercaptoetanol. Siete días después (segundo muestreo), se encontraron que dos sueros fueron positivos a la prueba de ALT con títulos de 1/20 y 1/40 (los títulos se convirtieron a logaritmos para poder obtener el promedio y así ver el comportamiento de los Ac en una gráfica), para este muestreo el promedio fue 0.116132 mientras que para la prueba de 2-mercaptoetanol resultaron serológicamente negativos. A los 14 días la respuesta serológica varió con la prueba de tubo obteniéndose títulos de 1/10 a 1/320, con un promedio de 0.47653, encontrándose que sólo 8 animales fueron seroreactores, mientras que la prueba de 2-mercaptoetanol, volvió a comportarse igual, dando una serología negativa para todos los sueros. A los 21 días (cuarto sangrado) la respuesta serológica varió con la prueba de tubo de 1/10 a 1/320, con un promedio de 0.97756 encontrándose que sólo 13 animales fueron seroreactores, mientras que la prueba de 2-mercaptoetanol, volvió a comportarse igual dando una serología negativa para la totalidad de los sueros. (Ver cuadro 1 y figura 8).

**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN PARA ANTIGENO DE
Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPO 1 (LOG).**

| SUERO | 1er. Muestreo | | 2o. Muestreo | | 3er. Muestreo | | 4o. Muestreo | |
|-----------------|---------------|------|--------------|------|---------------|------|--------------|------|
| | ALP | 2-ME | ALP | 2-ME | ALP | 2-ME | ALP | 2-ME |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.30103 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 | 1.90309 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 | 1 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.90309 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.30103 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.90309 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 1.30103 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| PROMEDIO | 0 | 0 | 0.1161232 | 0 | 0.476534 | 0 | 0.97756 | 0 |

Cuadro 1.

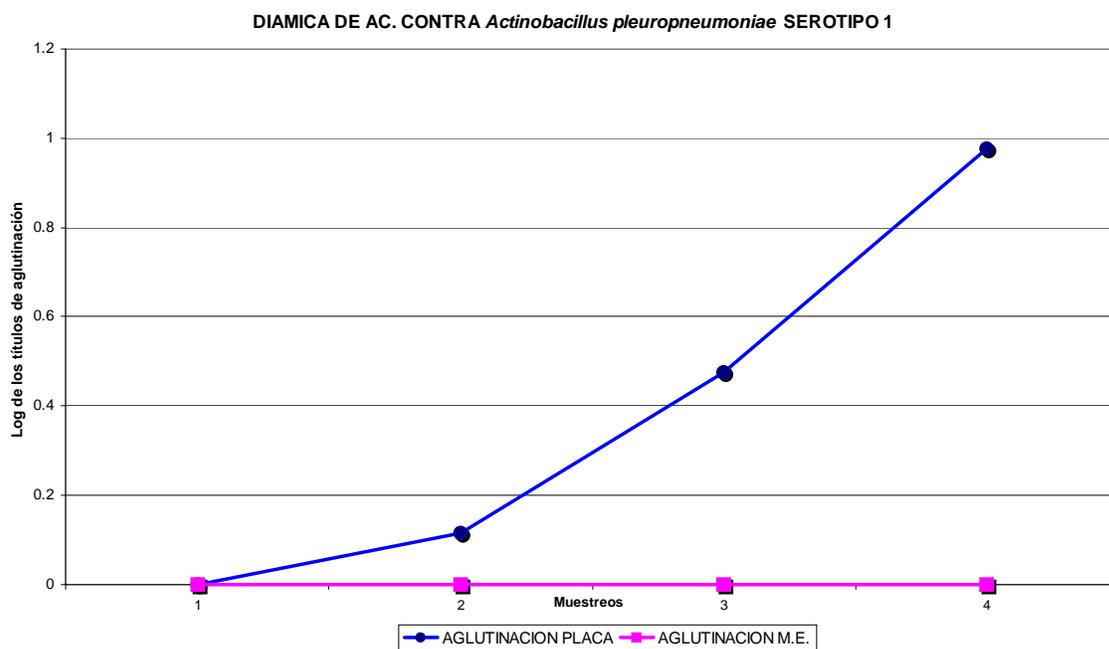


Figura 8.

Por otro lado utilizando el antígeno del serotipo 3 de *A. pleuropneumoniae* en el primer muestreo los sueros fueron negativos a la prueba de tubo y de mercaptoetanol dando animales seroreactores negativos. A los 7 días (segundo muestreo) se encontraron sueros seroreactores positivos con títulos que variaron de 1/10 a 1/320 con un promedio de 0.841236 obteniéndose un total de 14 animales seroreactores, mientras que con la prueba de 2-mercaptoetanol fueron negativos. En el tercer muestreo realizado a los 21 días con la prueba de tubo se encontraron títulos de 1/10 a 1/320 con promedio de 1.3767416, con un total de 13 animales seroreactores. Con la prueba de 2 mercaptoetanol no hubo sueros seroreactores. En el muestreo de 28 días (cuarto sangrado) se encontraron títulos más altos de 1/40 a 1/320 con promedio logarítmico de 2.0759552 en 23 de los sueros probados y en el caso de la prueba de 2-mercaptoetanol todos los sueros fueron seroreactores negativos. (ver cuadro 2 y figura 9)

**RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN PARA ANTIGENO
DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* SEROTIPO 3 (LOG).**

| SUERO | 1er. Muestreo | | 2o. Muestreo | | 3er. Muestreo | | 4o. Muestreo | |
|-----------------|---------------|------|--------------|------|---------------|------|--------------|------|
| | ALP | 2-ME | ALP | 2-ME | ALP | 2-ME | ALP | 2-ME |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1.60206 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2.20412 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 2.20412 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 1.90309 | 0 | 0 | 0 | 1.90309 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 2.20412 | 0 | 1.60206 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 1.90309 | 0 | 2.50515 | 0 | 1.60206 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 1.30103 | 0 | 0 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 | 1.90309 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 1.30103 | 0 | 1.30103 | 0 | 1.90309 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 | 1.60206 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.20412 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.30103 | 0 | 2.20412 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 1.30103 | 0 | 1.30103 | 0 | 1.90309 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 1.60206 | 0 | 1.90309 | 0 | 2.50515 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.20412 | 0 |
| PROMEDIO | 0 | 0 | 0.841236 | 0 | 1.3767416 | 0 | 2.0759552 | 0 |

Cuadro 2.

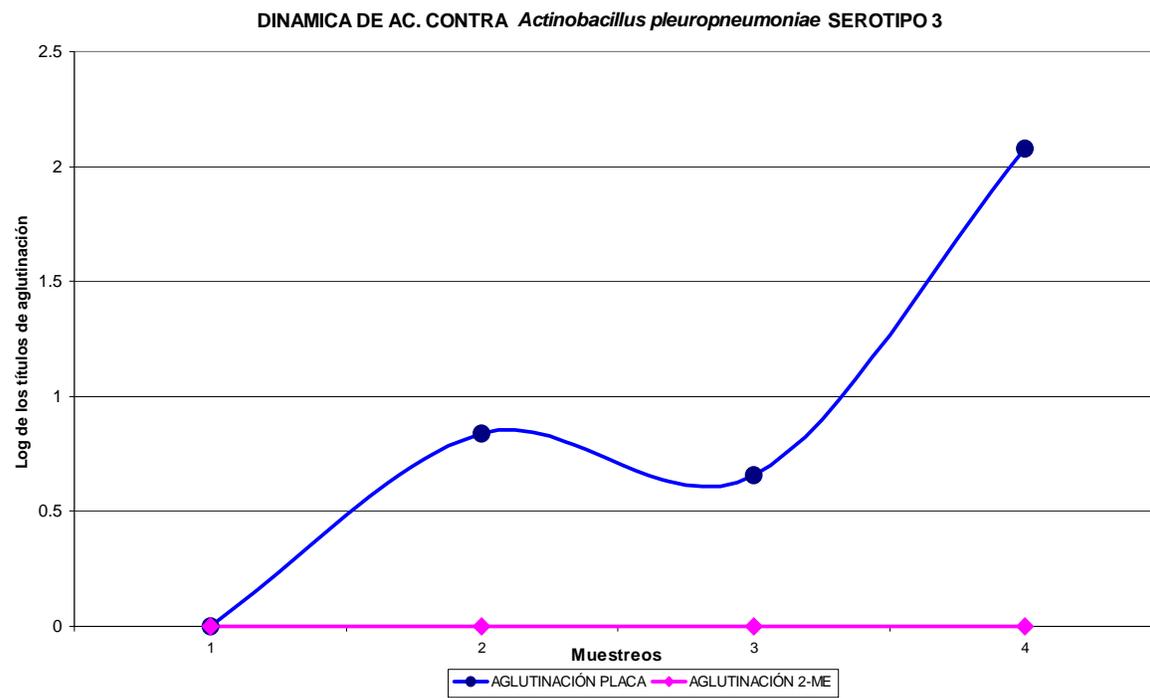


Figura 9.

5. DISCUSIÓN

El *A. pleuropneumoniae* causa una neumonía fibrinohemorrágica aguda, que causa generalmente pérdidas aguda por muerte en cerdos de 12 a 16 semanas de edad. La morbilidad puede llegar hasta el 100%, con una mortalidad de 20-80%, por lo que es necesario tomar medidas preventivas para dicha enfermedad, es por ello que se llevó a cabo la estandarización de las técnicas ALT y 2-mercaptoetanol para evaluar la sensibilidad de las pruebas en tubo y microplaca, ya que son utilizadas para otro tipo de bacterias y en este caso la estandarización fue específica para los serotipos App1 y App3. Las técnicas también nos sirvieron para evaluar si los sueros dieron respuesta inmunológica a la bacterina inoculada a los cerdos. No se controló el tipo bacterina, ya que es propia de la granja de la FMVZ de la UNAM.

Los sueros control utilizados en la estandarización de las técnicas, se consideran positivos y negativos debido a que fueron previamente evaluados con la técnica de PLEUROTTEST que como se explica en la introducción ésta basado en el principio de aglutinación directa.

Durante la estandarización de las técnicas de ALT y 2-mercaptoetanol, se logró que los resultados fueran reproducibles, ya que se realizaron por triplicado con los serotipos 1 y 3 de *A. pleuropneumoniae*, y en cada uno de los sueros control dando los mismos resultados tanto en tubo como en microplaca, pero con un mayor ahorro de reactivos y de tiempo en la técnica hecha en microplaca, por lo que se decidió analizar los sueros entregados por la granja, con las técnicas en microplaca.

La prueba de aglutinación lenta es una prueba que nos brinda una valiosa ayuda para la evaluación serológica de títulos que determinan el total de anticuerpos, ya que nos pone en evidencia la presencia de IgM como la respuesta primaria ante cualquier infección, además esta prueba es sencilla de hacer así como de interpretar, pero para completar la evaluación de la bacterina, es necesario evaluar también la presencia de los anticuerpos IgG que es la respuesta secundaria en toda infección, para dicha evaluación se utiliza la prueba de 2-mercaptoetanol la cual inactiva los Ac IgM, dejando solamente los Ac IgG, utilizando sólo las

cantidades necesarias de reactivo 2-mercaptoetanol, ésta también es una prueba muy sencilla de interpretar y de realizar.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la bacterina, en las gráficas nos muestran, que la respuesta de los serotipos 1 y 3 de App para la prueba de ALT, la cual nos evalúa, la presencia de anticuerpos IgM, presenta un comportamiento gradual de crecimiento de la respuesta inmunológica en cada sangrado, esto nos indicó que en el momento de la vacunación los cerdos sí respondieron, sin embargo, al realizar la prueba de 2-ME, la cual nos evalúa la presencia de IgG, no vemos aumento o presencia de estos Ac en la respuesta inmunológica en ninguno de los sangrados como se puede ver en las gráficas de ambos serotipos, lo que nos indica que los cerdos no presentaron anticuerpos IgG, estos nos dan memoria inmunológica a largo plazo, la cual es el objetivo principal de una vacuna para brindarnos protección durante un periodo prolongado, por lo tanto en este caso podemos decir que la bacterina utilizada no da una respuesta inmunológica a largo plazo.

Debemos mencionar que en la respuesta inmunitaria participan el individuo, la especie, la edad, la salud y el estado de nutrición del animal. Los animales muy jóvenes o muy viejos son menos adecuados y no deben emplearse. Los animales que se encuentran en un estado satisfactorio de salud responden más intensamente a las inyecciones del antígeno. A veces se producen bajas cuando se inyectan las vacunas a base de agentes vivos atenuados a animales enfermos, mientras que los sanos, o no reaccionan en absoluto o sólo lo hacen en pequeño grado (Rosendal. et. al, 1982). En nuestro caso no se sabe si los animales se encontraban enfermos, o si a causa de la vacuna enfermaron, pero antes de realizar el último sangrado los cerdos comenzaron a morir repentinamente (información dada por personal de la granja), por lo tanto, no podemos decir con certeza que la bacterina no sirve.

Otro punto que debemos tomar en cuenta es el estado de los sueros, es importante que su almacenamiento sea adecuado y de preferencia que no se encuentren hemolizados, ya que si se encuentran hemolizados, pueden afectar el resultado de las pruebas.

6. CONCLUSIONES

Fue posible la estandarización de las técnicas de aglutinación, ya que se logró reproducibilidad de las mismas, tanto en tubo como en microplaca, porque al comparar los resultados de la pruebas, las cuales se hicieron por triplicado, nos dieron resultados similares al hacer la lectura.

Se logró evaluar la respuesta humoral de los sueros de cerdos vacunados con la bacteria contra *A. pleuropneumoniae* serotipos 1 y 3, con las técnicas de ALT y 2-mercaptoetanol, obteniendo resultados positivos para Ac IgM y una respuesta negativa para Ac IgG, lo que nos indica que hubo una respuesta inmunológica primaria para App 1 y 3, pero no hubo una respuesta secundaria.

Se comprobó la sensibilidad de las técnicas en tubo y microplaca, porque con cantidades muy pequeñas de reactivos, fue posible una buena lectura, los resultados se apreciaba bien tanto en las microplacas como en los tubos, lo que nos permitió hacer las pruebas solamente en microplaca con los mismos resultados que en los tubos, pero con ahorro de reactivos y de tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alton, G.G., Jones M. L., Angus R.D., Verger J.M. (1975). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Ed. Biblioteca Pronabing, Institut National de la Recherche Agronomique 147. rue de Université, 75007 París. P: 171-173.
- Bach, Jean-Francois, et. al. (1984). Inmunología. Ed. Limusa, México. P: 20, 288-290, 293, 545-547, 577-578.
- Backstrom, L., Hoefling, D. C. (1982). Respiratory diseases of swine. Vet. Clin. N. Amer. Large Anim. Prac. P: 259-276.
- Blackall, P. J., H. L. Klaasen, H. Van den Bosch, P. Kuhnert, and Frey, J. (2002). Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. Vet. Microbiol. 84: 47-52.
- Carpentier P. L. (1982). Inmunología y Serología. 2ª edición, Ed. La Prensa Médica Mexicana, México D. F., P: 52-56.
- Cho, W.S and Chae, C. (2001). Expression of apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Comp. Pathol.*125: 34-40.
- Ciprián C. A., Mendoza, E.S., García, M. C. (1994). Primer Ciclo Nacional Afecciones Respiratorias del cerdo. F.E.S.-C, U.N.A.M. U.A.Y. México. P: 128.
- Cruz, W., Nedialkov, Y.A., Thacker, B., Mulks, M.H. (1996). Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 64:83-90.

- Darla, J. Wise and Gordon R. Carter. (2002). Inmunology. 5ª edición, Ed. A. Blackwell Science Company, Estados Unidos, Iowa, P: 49-59.
- Didier, P.J., Perino, L., Urbance, J. (1984). Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* microbiological and pathological findings. J.A.V.M.A. 184 : 715-719.
- Eli Benjamín, et. al.(2002). Inmunology A Short Course. 4ª edición, Ed. Wileylliss, Estados Unidos, P: 91-97.
- Enríque-Verdugo, I., Guerrero, A.L., Godínez-Vargas, D., Martínez-Zúñiga, R., Hamer-, Barrera, R.C., and de la Garza, M. (2002). *Actinobacillua pleuropneumoniae* serotype 1 adheres to pig-lung collagen in vitro. J Bact.. (En prensa).
- Fenwick, B. (1990). Diagnóstico de pleuroneumonía porcina en el laboratorio. Compendio sobre *Actinobacillus (Hahemophilus) pleuropneumoniae*. AMVEC. 17.
- Frey, J. (1995). Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* 3: 257-261.
- García-Cuéllar, C., Montañez, C., Tenorio, V., Reyes-Esparza, J., Durán, M.J., Negrete, E., Guerrero, A., y de la Garza, M.(2000). A 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus Pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin *in vitro*. *Can. J. Vet. Res.* 64: 88-95.
- García-Cuéllar, C., Tenorio, V., Negrete, E., Godinez, D., Alvarez, J., Serrano, J., Reyes, M., de la Garza, M.(1995). *Actinobacillus Pleuropneumoniae*: una bacteria nociva para la porcicultura mexicana. *Avance y Perspectiva* 14: 173-180.
- Garibay, E., Ciprián, C. A., Mendoza, E. S., Gonzáles. G. S., Hernández-Baumgarten, E. (1993). Apéndices extracelulares en *Actinobacillus pleuropneumoniae* aislados de

casos agudos de pleuroneumonía contagiosa porcina. XXVIII Congreso A.M.V.E.C. Cancún Quintana roo. P:283.

- Gerrlach. G.F., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi- Campos, A. Potter, A. A., Wilson, P.J. (1993). Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (Oml A) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Infect. Inmmun. 61:565.
- Gerrlach. G.F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A. A., Wilson, P.J. (1992). Characterization of two genes encoding distinct transferring binding proteins in diferents *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. Infect. Inmmun. 60: 3253.
- Gunnarson, A., Hurvell, b., Biberstein, E.L. (1977). Serological studies of porcine strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* : Antigenic specificity and relationship between serotypes. Am. J. Vet. Res. 39(8) : 1286- 1292.
- Haesebrouk, F., Chiers, K., Van Overbeke, I., Ducatelle, R. (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* 58:239-249.
- Henry S. y Marsteller, t. (1982). Memorias del Congreso I.P.V.S. Brasil, P:72.
- Janaway, Jr., et. al.(2003). Inmunología, el Sistema Inmunitario en Condiciones de Salud y enfermedad. 2ª edición, Ed. Manson, Barcelona, España, P: 579-592.
- Kumate, Jesús,(1977). Inmmunidad-Inmunización Vacunas, Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, México DF. P: 5.
- Maqueda, A.J. (1977). Incidencia de neumonía enzoótica en varios estados porcicultores de cerdos de la República Mexicana. México, AMVEC, UNAM.

- Mendoza, E.S., Ciprián C. A. (2001). Tercer Ciclo Nacional de Enfermedades Respiratorias. Curso teórico práctico. F.E.S.-C, U.N.A.M.
- Merchan, T., I.A., Packer R.A.(1970) Bacteriología y Virología Veterinarias. 3ª edición, Ed. Acribia Zaragoza, España, P: 137-148, 157-164.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. (1983). Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagulation test. J. Clin Microbiol. 18 : 1351-1354.
- Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S., Leblanc D. (1984). A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumonia* infection in pigs. Am J. Vet. Res 45:715-719.
- Nakai, T., Sawata, A. (1985). Duration of the complement-fixation antibodies in pigs and guinea pigs by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccine. Jpn. J.Vet. Sci. 47 : 503-506.
- Negrete, E., García-C. C., Tenorio, V., Godinez, D., Alvarez, J., Serrano, J., de la Garza, M. (1994). Secreted proteases from *Actinobacillus Pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin, and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.* 58:83-86.
- Negrete, E., Tenorio, V., Guerrero, A.L., García, R.M., Reyes, M.E., de la Garza, M. (1998). Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus Pleuropneumoniae* Serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Can. J. Vet. Res.* 62: 183-190.
- Nicolet, J. (1971). Sur l'hémophiluse du porc. III. Diferenciation serologique *H. parahrmolyticus*. Zentralbl. Bakteriologie. Abt. 1 Orig. B. 216, 487-495.

- Nicolet, J., School, E. (1981). Haemophilus infections. Diseases of swine. 5th. De. (a.D. Leman et. al.. eds). Iowa State University Press, Ames. P: 368-377.
- Nielsen, R. (1974). Serological and immunological studies of pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus parahemolyticus. Acta Vet. Scan 15 : 80-89.
- Nielsen, R. (1979). Nord. Vet. Med. 31: 413-417.
- Nielsen, R. (1984). Nord. Vet. Med. 36: 221-234.
- Nielsen, R. (1985). Memorias del Compendium of Swine Haemophilus Pleuropneumonia.
- Nielsen R., M. Mandrup. (1977). Pleuroneumonia in swine caused by Haemophilus parahaemolyticus. A study of the epidemiology of the infection. Nord Vet. Med. 29: 465-473.
- Olander, H.J. (1963). A septicemic disease of swine and its causative agent : H. parahemolyticus. Ph. D. thesis, University of California, Davis.
- Ortíz, A. y Pijoán, C. (1980). Memorias del Simposium “Haemophilus y su importancia Biológica”. UAM-Xochimilco, México.
- Pijoan, C (1982). Haemophilus pleuropneumoniae. Mod. Vet . Prac. 63 : 653-645.
- Piojan, C., Cruz, G., Martínez, H. Arizpe, H. (1982). Memorias del Congreso I.P.V.S. (México) P: 70.
- Piojan, C., Ochoa, G., Méndez, D. y Lastra, A. 1978. Téc. Pec. Méx. 34:85-87.

- Piojan, C., Morrison, R.B. (1983). Haemophilus pleuropneumoniae. Proc. Ann. Conf. Swine Herds Health Programing. P: 199-206.
- Pohl, S., Bertschinger, H.U., et. al. (1983). Transfer of Haemophilus pleuropneumoniae and Pasterella haemolytica-organism causing porcine necrotic pleuroneumonia to the genus Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae comb nov.) on the basis of fenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Inr. J. Syst. Bact. 33, 510-514.
- Roitt, I. M.(2003). Inmunología Fundamentos. 10^a edición, Ed. Panamericana, Argentina. P: 32, 37, 216-222.
- Rojas, Espinosa Oscar. (2001). Inmunología (de memoria). 2^a edición. Ed. Medica Panamericana. México D.F. P: 157-163.
- Rojas, M. William. (2001). Inmunología, 12^a edición, Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas, Bogotá, Colombia, P: 155- 163.
- Rosendal, S., Boyd, D.A. (1982). H. pleuropneumoniae serotyping. J. Clin Microbiol. 16(5) : 840-843.
- Rosendal, S., Lombin, L, De Moor, J. (1981). Serotyping and detection of Haemophilus pleuropneumoniae by indirect fluorecent antibody technique. Can. J. Comp. Med. 45 : 271-274.
- Rosendal, S., Mittal, K.R. (1985). Comparative virulence of porcine Haemophilus bacteria. Canad. J. Comp. Med. 49 :68-74.
- Rosendal, S., Mittal, W.R. (1983). Epidemiology of Haemophilus pleuroneumoniae infection in pigs. A souvey of Ontario pork production. Canad. J. Comp. Med. 47: 1-5.

- Sanford, S.E., Josephson, G.K.A. (1981). Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* epizootic in southwestern Ontario : clinical, microbiological pathological and some epidemic findings. Canad. J. Comp. Med. 45 : 2-7.
- Schultz, R.A. (1982). Prevalence of antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* in Iowa swine. A .J .V .R . 43 : 1848-1851.
- Shope, R.E. (1964). Porcine contagious pleuroneumonia I y II . Experiment transmission, etiology and pathology. J. Exp. Med. 19 : 357-368.
- Thomas J. Inzana. (1990). Propiedades Biofísicas y de virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Ed. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. P:10-1

Sitio en Internet

- Info@labgemenis.com