

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA

DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN

**DESARROLLO Y EXPERIMENTACIÓN DE UNA
BACTERINA/TOXOIDE DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*
EN CERDOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ADRIANA CIPRIAN ARRATIA

ASESOR: M.V.Z., M. en C., DR. en C. ABEL CIPRIAN 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.

Abel, Clara y Daniela.

Kandy



...

AGRADECIMIENTOS:

ESTE ESTUDIO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE "ENFERMEDADES RESPIRATORIAS DEL CERDO", CON FINANCIAMIENTO PARCIAL DE LA CATEDRA "AFECCIONES BACTERIANAS Y VIRALES DEL CERDO" No. CONS. 112. ESTE ESTUDIO TAMBIEN FUE PARCIALMENTE FINANCIADO POR EL PAPIIT No. IN223203-2.

SE AGRADECE A LA DRA. MONSERRAT TORREMORELL DE PIG IMPROVEMENT COMPANY (PIC/GENUS), FRANKLIN, K., USA POR EL DONATIVO DE LOS CERDOS PARA ESTA INVESTIGACION.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
Características de crecimiento y cultivo	12
Características generales y morfológicas	8
Características metabólicas	13
Control de la enfermedad mediante la vacunación	36
Daño a los tejidos e interacción entre las toxinas RTX y las células blanco.....	23
Epidemiología	26
Tabla 3. Distribución de los distintos serotipos aislados en Canadá en los últimos años.....	28
Tabla 4. Distribución geográfica de los distintos serotipos.....	30
Etiología	8
Factores de virulencia	15
Adhesinas.....	15
Adquisición de hierro	17
Cápsula	16
Membrana Externa	16
OTROS PRODUCTOS.....	18
Proteasas	18
Toxinas de tipo RTX.....	19
Ureasa	18
Mecanismos de defensa del huesped.....	22
Métodos de diagnóstico de las enfermedades respiratorias bacterianas	32
Tabla 1. Principales características metabólicas	14
Tabla 2. Producción de toxinas por los diferentes serotipos.....	21
Taxonomía y Clasificación	10

CONTROL DE LA ENFERMEDAD MEDIANTE LA VACUNACIÓN

Bacterinas atenuadas	38
Bacterinas conjugadas.....	42
Bacterinas de cuerpo completo.....	36
Bacterinas de extractos celulares	38
Bacterinas de subunidades.....	39
Toxoides.....	41
Inicios de las bacterinas contra Pleuroneumonía Contagiosa Porcina en México.....	44
JUSTIFICACIÓN	48
OBJETIVO GENERAL	52
OBJETIVOS PARTICULARES	54
MATERIAL Y MÉTODOS.....	56
Diseño experimental	71
Animales.....	71
Inmunización	72
Sangrados	73
Evaluación de los signos clínicos.....	82
Signos clínicos.....	82
Temperatura	82
Figuras	
1-8	78
9-11	80
Inóculo.....	77
Materiales.....	56
Equipo	59
Material biológico.....	58

Material de Laboratorio.....	56
Reactivos.....	60
Metodología	64
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	68
Adyuvante.....	70
Aislamiento e indentificación	69
Inactivación.....	70
Inmunógeno Comercial	71
Preparación de medios de cultivo	64
Medios líquidos	67
Medios sólidos	58
Reactivación de la cepa bacteriana.....	60
Planimetrías	85
Preparación de las placas antigenadas	76
Preparación del antígeno	74
Prueba de ELISA	73
Purificación del antígeno.....	74
Recuperación de los agentes inoculados	85
Sacrificio y Necropsia.....	82
Serotipificación de los aislamientos	86
Sistema de desafío por nebulización	77
RESULTADOS	88
Evaluación de las lesiones neumónicas	102
Figura	
17-19	98
Grado de lesión neumónica	113

Identificación de App.....	91
Pruebas bioquímicas	91
Tinción de Gram	91
Inmunización	92
Necropsia	100
Planimetrías	113
Preparación de lote de BactTox.....	92
Prueba de ELISA Inmunogenicidad	93
Prueba de Potencia.....	95
Reactivación de la cepa bacteriana	88
Aislamiento	88
Satelitismo	88
Recuperación de los agentes inoculados	114
Serotipificación de los aislamientos	114
Signos clínicos observados.....	90
Figura 12. Resultado de la Prueba de Satelitismo.....	89
Figura 13. Resultado de la Prueba de Satelitismo.....	89
Figura 14. Resultados del requerimiento del factor V	90
Tabla 5. Pruebas bioquímicas.....	91

Evaluación de las lesiones neumónicas

Figuras

26-30	108
Figuras 20-21	103
Figuras 22-25	105
Figuras 31-33	111

Prueba de Potencia

Figura 16.....	95
DISCUSIÓN.....	116
CONCLUSIONES.....	135
REFERENCIAS.....	137

RESUMEN

En la FES-Cuautitlán UNAM, se ha trabajado y patentado un desarrollo tecnológico denominado “Proceso para elaborar un Toxoide-inmunogeno de *Actinobacillus pleuropneumoniae* para la prevención de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina”. Por los antecedentes anteriores, y el papel que juegan los diferentes antígenos de *A. pleuropneumoniae* y sus productos extracelulares; con la idea de tener un solo inmunogeno, se diseñó una bacterina que cubriera los requisitos de evitar la muerte y disminuir el grado de las lesiones neumónicas, que fuera capaz por su contenido de proteger contra la mayoría de los serotipos presentes en México. Para ello se elaboró esta bacterina toxoide (BactTox) con los serotipos 1, 2, 3, 5a y por las Apx que excretan estos serotipos. En el diseño experimental, se utilizaron 16 cerdos de cinco semanas de edad, de raza Yorkshire, libres de anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Pasteurella multocida*; Enfermedad de Aujeszky y vPRRS. Se formaron cuatro grupos de 4 cerdos cada uno de ellos: Grupo A: Control (-) no vacunado y no desafiado; Grupo B: Control (+) no vacunado y desafiado; Grupo C: ToxCom vacunado dos veces a intervalo de 15 días y desafiado; Grupo D: BactTox vacunado dos veces a intervalo de 15 días y desafiado. En los animales del grupo D, la bacterina BactTox produjo dos picos de hipertermia en los cerdos cuando fueron inmunizados. Posterior al desafío los

cerdos vacunados presentaron fiebre pero no murieron dentro de las 96 horas. Los signos clínicos respiratorios en los cerdos del grupo B no vacunados fueron graves. Los cerdos vacunados de los grupos C y D no murieron y fueron sacrificados después de las 96 horas. En el grupo A, todos los animales del grupo presentaron pulmones sin cambios patológicos aparentes (SCPA) tanto en su vista dorsal como en la ventral. En los grupos B, C y D, los animales presentaron lesiones neumónicas bilaterales principalmente en los lóbulos caudales. Las aéreas neumónicas fueron oscuras, sólidas y friables al corte, acompañadas de adherencias pleurales. También se encontraron nódulos parecidos a abscesos delimitados por una cápsula delgada de tejido conectivo. El grado de lesiones neumónicas encontradas en los lóbulos pulmonares con las planimetrías realizadas, revelaron los siguientes porcentajes: BactTox 11.0 +/- 2.62; ToxCom 26 +/- 12.5; Control positivo 33 +/- 4.6 y control negativo 0. La bacteria BactTox redujo las lesiones neumónicas hasta en un 66%, mientras que la bacteria ToxCom redujo las lesiones neumónicas solo en el 21%.

INTRODUCCIÓN.

La pleuroneumonía es una de las enfermedades bacterianas más importantes del tracto respiratorio de los cerdos, causada por los diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se presenta en muchos países con explotaciones porcinas. En Estados Unidos y Canadá, la enfermedad clínica es relativamente fácil de controlar, pero en América Latina y ciudades europeas, aún es un gran problema (Gottschalk et al., 2003). Su importancia deriva en el hecho que puede causar neumonía que resulta en la muerte del animal, la enfermedad clínica puede conllevar a la enfermedad crónica o subclínica en un conjunto de cerdos causando pérdidas por muerte, reducción en la producción y el incremento en los costos de medicación o vacunación. Para los clínicos la pleuroneumonía es un problema ya que los animales pueden ser tratados con antimicrobianos efectivos contra el microorganismo, pero no pueden responder por la severidad y por su naturaleza de las lesiones iniciales.

Muchos hatos pueden estar infectados subclínicamente sin presentar episodios evidentes del padecimiento y con ausencia de lesiones sugestivas en el rastro. Esto sucede frecuentemente en hatos convencionales que pueden ser infectados simultáneamente no solo con varios serotipos de baja patogenicidad sino también con serotipos de alta patogenicidad.

En estos casos, los brotes pueden aparecer súbitamente en la presencia de enfermedades concomitantes o como consecuencia de cambios en el manejo. La identificación temprana de los hatos infectados subclínicamente es importante para el control porque los animales portadores son la principal fuente de transmisión entre el hato.

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente etiológico de la pleuroneumonía en cerdos. La primera observación de esta enfermedad fue hecha por Pattison et al., (1957), Matthews y Pattison (1961), y Olander (1963). Shope (1964) más tarde describió un brote agudo muy similar a la infección en una granja de Argentina.

La designación *Haemophilus parahaemolyticus* se dio a las cepas de California (Olander 1963) y en los aislamientos suizos (Nicolet 1968) es considerado como un sinónimo. El nombre *Haemophilus pleuropneumoniae* fue dado al organismo por Shope et al., (1964) y White et al., (1964). El nombre fue confirmado por Kilian et al., (1978), y *H. parahaemolyticus* después fue transferido al género *Actinobacillus* y designado como *Actinobacillus pleuropneumoniae* después de realizar estudios de homologación ácido desoxirribonucleico (ADN) ya que se demostró la relación cercana de *H. pleuropneumoniae* con *Actinobacillus lignieresii* (Pohl et al., 1983).

Los organismos parecidos a la *Pasteurella haemolytica* descritos por Bertschinger y Seifert (1978) fueron los agentes causales de la pleuroneumonía necrosante siendo considerados como biotipos independientes de la nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) del *A. pleuropneumoniae* (Pohl et al. 1983) y que después se reconoció como *A. pleuropneumoniae* biotipo II.

ETIOLOGÍA

El agente etiológico es *Actinobacillus pleuropneumoniae* (anteriormente conocido como *Haemophilus parahaemolyticus*, y después como *Haemophilus pleuropneumoniae*.) es pequeño, no móvil, Gram negativo, pleomórfico, bacilo encapsulado con la típica morfología cocobacilar, anaerobios facultativos. No crece en agar MacConkey. La temperatura óptima de crecimiento es 37°C. (Kilian et al., 1978a).

CARACTERÍSTICAS GENERALES Y MORFOLÓGICAS

Desde el punto de vista morfológico, es una bacteria que se presenta en el microscopio óptico como pequeños cocobacilos pleomórficos (0.5-1 x 1-2 µm), Gram negativos, son fermentativos, hemolíticos, anaeróbios facultativos e inmóviles (Kilian et al., 1978a), aunque estudios de Negrete et. al., (2003) demuestran

que produce un flagelo compuesto de una proteína de 65 kDa, que le proporciona motilidad. Posee una membrana externa en donde se incluye el lipopolisacárido ó LPS y distintos tipos de proteínas de gran interés (proteínas de membrana externa). La cápsula, que se relaciona con la patogénesis, está compuesta por oligosacáridos repetitivos. En aislamientos recientes se ha descrito la presencia de fimbrias. Requiere del factor V (NAD) para crecer (Frey, 1989; Frey, 2003).

Es muy lábil en el medio ambiente, en el laboratorio no sobrevive más de 8 a 10 días en caldo a temperatura ambiente (independientemente de la suplementación o no con NAD) y a la temperatura de 4°C, la supervivencia solo llega a los 18 días. Resulta adecuada para su conservación prolongada la utilización de temperaturas de -80°C en un medio que incluye leche descremada y glicerina, al igual que la liofilización. Es destruido por la mayoría de los desinfectantes, especialmente los derivados de cloro (Frey, 2003).

TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN

La clasificación taxonómica de *Actinobacillus pleuropneumoniae* presenta:

Familia: *Pasteurellaceae*, al igual que los géneros *Pasteurella* y *Haemophilus*.

Género: *Actinobacillus*.

Especie: *pleuropneumoniae*.

Basados en el requerimiento del factor V, las cepas de *A. pleuropneumoniae* pueden ser divididas en: Biotipo I: son NAD – dependiente (Moller et al., 1990) y Biotipo II: son NAD – independiente (Pohl et al., 1983). A la fecha se han descrito 15 serotipos del biotipo I. En donde solo el serotipo 5 fue dividido en dos subtipos 5a y 5b.

La serotipificación está basada principalmente en los polisacáridos capsulares y los lipopolisacáridos de la pared celular. Todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* pueden ser severos e incluso ocasionar la muerte en cerdos, hay indicaciones que la virulencia es variable. La virulencia parece estar más o menos relacionada al biotipo o serotipo y de acuerdo a esto se agrupan en: Virulentos y menos virulentos. Donde, experimentos y observaciones confiables de la infección proveen evidencias que el biotipo II es menos virulento que los del biotipo I. También indican que dentro del biotipo I, el serotipo 1, 5a, 5b, 9 y 10 son más virulentos que el resto de los serotipos de este biotipo. (Inzana, et al., 1988; Perry et al., 1990; Gottschalk 1998; Blackall et al., 2002).

CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO Y CULTIVO

Crece bien a 37 °C, preferiblemente en presencia de 5% CO₂, al menos en los cultivos iniciales. Crecen habitualmente en agar chocolate, medios suplementados con NAD: como agar PPLO (Pleuropneumonia-like organisms), Todd – Hewit, caldo o agar BHI, Soya - tripticaseína; además, agar sangre al 5% con una estría de la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, que produce el factor V y permiten observar el fenómeno de satelitismo. (Shope, 1964; Nicolet, 1968; Killian et al., 1978). Las estrías de estafilococos normalmente son requeridas para los aislamientos primarios en este medio.

El biotipo I forma colonias de 0.5 – 1.0 mm lisas y brillantes o mates, de aspecto céreo, de color gris blanquecino y olor característico después de 24 horas de incubación en agar sangre; son beta-hemolíticas, particularmente cuando es utilizada la sangre de ovinos. El biotipo I es dependiente del NAD (ya que tienen una cadena respiratoria incompleta y carecen de NAD), y produce un incremento de hemolisis en la zona de lisis parcial de la toxina beta de *S. aureus* produciéndose el Fenómeno de CAMP (Nicolet 1970; Kilian 1978b), el fenómeno de CAMP está demostrado que está relacionado con la presencia de las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII (Frey et al., 1993; Frey et al., 1995; Jansen et al., 1995).

CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS

Actinobacillus pleuropneumoniae posee las enzimas que le permiten tener un metabolismo relativamente activo comparándola con otras bacterias. Todos los serotipos son hemolíticos y producen CAMP positivo (Nicolet 1970; Kilian 1976). Todos los serotipos son ureasa positivos (ver tabla 1).

Tabla 1. Principales características metabólicas encontradas en los diversos serotipos de la biotipo I de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Reacción bioquímica	Resultado	Reacción bioquímica	Resultado
Requerimiento de factor V	+	Producción de gas a partir de:	
Producción de porfirina a partir del ácido d-aminolevulínico	+	Glucosa	-
Indol	+	Fructosa	+
Ureasa	+	Sacarosa	+
Ornitín descarboxilasa	-	Lactosa	Variable
Arginín dihidrolasa	-	Xilosa	+
Hemólisis	+	Ribosa	+
Hemaglutinación	-	Manosa	+
Reacción CAMP	+	Manitol	+
b-galactosidasa (ONPG)	+	Sorbitol	-

a-fucosidasa	-	Arabinosa	-
Catalasa	Variable	Ramnosa	-
Fosfatasa alcalina	+	Galactosa	+
a-galactosidasa	+	Maltosa	+
a-glucosidasa	-	Melibiosa	-
b-glucosidasa	-	Trehalosa	-
a-manosidasa	-	Melicitosa	-
b-xilosidasa	-	Rafinosa	Variable
Lisina descarboxilasa	-	Inulina	-
Oxidasa	Variable	Dulcitol	-
Ubiquinona	+	Glicerol	-
Naftoquinona	+	meso-eritritol	-
SH2	+	Inositol	-
b-glucuronidasa	-	Xilitol	-
Reducción de nitratos	+	Esculina	-
Reducción de nitritos	+	Salicina	-
Producción de ácido a partir de glucosa	+		

FACTORES DE VIRULENCIA.

Adhesinas. El papel de las adhesinas, como en otros microorganismos, les permite la expresión bacteriana de adhesión a las líneas celulares en un nicho particular, así como en la superficie de la llamada célula blanco propiciando el inicio de la enfermedad (en muchos casos, el nicho y la célula blanco pueden ser

lo mismo). Su expresión depende de varias señales del ambiente. Muchos o probablemente todos, los miembros de la familia *Pasteurellaceae* las expresan (y posiblemente más de un tipo) (Haesebrouck, 1997; Dubreuil, et al., 2000).

No se conoce mucho sobre ellas en otro actinobacilo asociado con enfermedades de importancia en veterinaria, excepto en *A. pleuropneumoniae*; donde se adhiere a dos diferentes tipos de células: las de cavidad nasal y las tonsilas (este es el caso típico de los animales portadores), y las células de las bronquios terminales y alveolos (antecedente de la enfermedad). Produce dos estructuras que funcionan como adhesinas. La primera es una adhesina en sentido clásico, una estructura compuesta de subunidades proteicas cuya función principal es unirse a la superficie de las células huésped; son fimbrias tipo 4, y son desconocidas por el tipo de célula y se adhieren. El otro tipo, es la pared celular que es un lipopolisacárido, no es usual considerarlo una adhesina. Sin embargo, es responsable de la adherencia del microorganismo a las células del tracto respiratorio bajo de los cerdos. (Perry et al., 1990; Dubreuil, et. al. 2000).

Cápsula. La cápsula tiene como factor principal de patogénesis y quizás el más importante de todos en la interferencia de la fagocitosis (anti-fagocítica) y la protección de la membrana externa del ataque generado por la activación del sistema del complemento. La cantidad de cápsula producida es proporcional a la cantidad de hierro disponible. Es difícil conciliar la expresión de la cápsula y

lipopolisacárido como una adhesina en la adherencia del microorganismo. (Inzana, et. al.1988).

Membrana Externa. El lipopolisacárido provoca una respuesta inflamatoria encontrándose una asociación con proteínas unidas al él (proteínas séricas), que a su vez lo transfiere a la etapa sanguínea del CD14. El complejo LPS-CD14 se une a las proteínas de los receptores Toll en la superficie de los macrófagos que acciona el lanzamiento de las citocinas pro-inflamatorias. (Inzana, et. al., 1988; Perry et al., 1990; Rioux, et al., 1998; Rioux, et al., 1999).

Adquisición de hierro. El hierro es un requerimiento importante para su crecimiento, adquiere este elemento si está dentro del huésped. Se unen al complejo hierro-transferrina en virtud de la regulación del hierro de las proteínas de membrana externa, expresadas bajo condiciones pobres en hierro (llamadas proteínas unidas a la transferrina o Tbps). El hierro es adquirido por los complejos hierro-transferrina que están unidos a la superficie del microorganismo. Además, de adquirir el hierro por la vía del Tbps, también utiliza sideróforo (ionóforo de hierro; ambos hidroxamatos y catecoles) producidos por otras especies de bacterias aun cuando no los produce por si mismo (Jacobsen, 2005).

OTROS PRODUCTOS.

Proteasas. Otros productos producidos (especialmente los miembros de la Familia *Pasteurellaceae*) que pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad se incluyen las proteasas contra IgA e IgG (previenen la adherencia y la opsonización, respectivamente), y dismutasa superóxido periplásmico (como una estrategia de prevención de la digestión sin la formación del fagolisosoma por la inactivación de las moléculas de superóxido) (Negrete et al 1994).

Ureasa. Se ha demostrado que es importante en la enfermedad (es desconocido si esta enzima juega algún papel en la producción de la enfermedad por otras especies de actinobacilos que son ureasa positivos). Es responsable de la liberación de amoníaco por la urea (la asociación constante de la ureasa de *A. pleuropneumoniae* es extremadamente alta permitiendo la asociación efectiva con concentraciones muy bajas de urea encontrada en sangre y fluidos). Además, de la atracción y la activación de neutrófilos y macrófagos, el amoníaco inhibe la fusión del fagolisosoma e incrementa el pH sin fagolisosoma, de tal modo que reducen la eficiencia de varios ácidos hidrolizables. Estos efectos resultan no solo en la disminución en la habilidad del huésped de deshacerse del microorganismo de los pulmones, sino también de asegurar la colonización eficaz del tracto respiratorio alto, de tal modo que promueven el estado de portador (mutantes

incapaces de producir ureasa son eliminados rápidamente del tracto respiratorio) (Bossé y MacInnes, 2003).

Toxinas de tipo RTX. El tipo de toxina RTX (el término de repeat in toxin, es debido a la característica común de repeticiones en secuencias de un péptido rico en glicina) es producida por *A. pleuropneumoniae*, *A. suis* y *A. rossii* (Frey et al., 1993; Ling, et al., 2006). La toxina es denominada Apx (toxina de *A. pleuropneumoniae*) *Actinobacillus equuli* spp., *haemolytica* produce una toxina muy similar Apx (toxina de *A. equuli*). Muchos piensan que *A. lignieresii* contiene genes codificadores de Apx, que no los expresa (carece del promotor de funcionamiento). Son miembros de una familia proteica que son sintetizadas por un grupo diverso de patógenos Gram-negativos. Los miembros de de la familia de las toxinas RTX, incluyendo las toxinas citolíticas, metaloproteasas y lipasas, todas tienen en común la organización de genes y una estructura característica (Schaller et al., 2000).

Así como otros tipos de toxinas RTX, hay un efecto de la dosis. A baja concentración estas toxinas interfieren con la función de macrófagos y neutrófilos por el principio de la degranulación y a altas concentraciones son citolíticas por los macrófagos, neutrófilos y células del epitelio alveolar. Además, las toxinas RTX lisan eritrocitos (Bauer y Welch 1996) y son responsables de la reacción de CAMP cuando se coloca una estría cruzada de la cepa de *S. aureus* productora de la

beta toxina. El efecto en los eritrocitos probablemente participa poco en la producción de la enfermedad. Son 4 tipos de la toxina Apx (ApxI, ApxII, ApxIII, ApxIV) cada una con diferente grado de citotoxicidad (ApxI es la más potente de las cuatro, seguida por ApxIII y después ApxII, la potencia de la ApxIV es desconocida). Los actinobacilos pueden contener, los genes que codifiquen cualquier combinación de las cuatro toxinas. En el caso de *A. pleuropneumoniae*, serotipos 1, 5, 9, 10 y 11 producen ApxI, todos los serotipos (excepto serotipo 10) producen ApxII, los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8 producen ApxIII y todos los serotipos producen ApxIV (Frey et al., 1993; Schaller, et al., 2000; Ling, et. al. 2006).

Tabla 2. Producción de toxinas (Apx) por los distintos serotipos

	Operon			Actividad		MW (kDa)	Serotipo
	Activador	Estructural	Exportador	Hemolítica	Citolítica		
ApxI	<i>apxIC</i>	<i>apxIA</i>	<i>apxIBD</i> ¹	Fuerte (+++)	Fuerte (+++)	105- 110	1, 5 ^a , 5b, 9, 10, 11
ApxII	<i>apxIIC</i>	<i>apxIIA</i>	Ninguno ¹	Débil (+)	Moderado (++)	103- 105	Todos menos 10
ApxIII	<i>apxIIIC</i>	<i>apxIIIA</i>	<i>apxIIIBD</i>	Ninguno (-)	Fuerte (+++)	120	2, 3, 4, 6, 8
ApxIV₂	ORF1 ³	<i>apxIVA</i>	Ninguno ¹	Débil (+)	ND ⁴	200 ⁵	Todos

Fuente: Frey et al. (1993) y Schaller et al. (2000).

¹ Los genes *apxIBD* fueron encontrados en todos los serotipos excepto 3. Secreción de *ApxII* ocurre vía *ApxIBD*. No se sabe nada todavía con respecto a la secreción de *ApxIV*.|

² Diferente de otras toxinas *Apx*, *ApxIV* sólo se produce *in vivo*.

³ ORF1 parece ser requerido para la actividad *ApxIV*, aunque no comparte ninguna homología con *ApxIC*, *ApxIIC* o *ApxIIIC*.

⁴ No determinado.

⁵ La masa molecular de *ApxIV* se predice de la secuencia de la proteína.

MECANISMOS DE DEFENSA DEL HUESPED.

Los efectos de la infección por sí mismo en la actividad mucociliar de *A. pleuropneumoniae* no se han investigado todavía, pero es posible que las toxinas RTX puedan tener un efecto en la actividad ciliar (Narita et al., 1995).

Los factores principales implicados en la debilitación de la función fagocítica de macrófagos y polimorfonucleares son las tres toxinas RTX (*ApxI*, *ApxII* y *ApxIII*) producidas en varias combinaciones por los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae*. En las dosis altas, estas toxinas deterioran la quimiotaxis del macrófago y su función fagocítica, mientras que el mecanismo oxidativo de macrófagos y polimorfonucleares es estimulado. A altas concentraciones de *ApxI* y *ApxIII* son altamente tóxicas y de *ApxII* es moderadamente tóxica para macrófagos alveolares y polimorfonucleares. Sin embargo, el daño provocado a los macrófagos alveolares por mutantes deficientes de *ApxII* y *ApxIII* de *A. pleuropneumoniae*

serotipo 2 indican que otros factores que están asociados a las células pueden estar involucrados. La posible contribución que recientemente se describió en la toxina ApxIV es el daño a macrófagos y polimorfonucleares, pero todavía tiene que ser estudiado (MacInnes y Bossé 2004).

DAÑO A LOS TEJIDOS E INTERACCIÓN ENTRE LAS TOXINAS RXT Y LAS CÉLULAS BLANCO

La mayor parte de los cambios patológicos de la pleuroneumonía porcina pueden ser atribuidos a las toxinas Apx, que tienen un efecto citotóxico directo en varios tipos celulares así como a la liberación indirecta de estimulantes de mediadores inflamatorios (Frey, 1995; Maier, et al., 1996; Bosse et al., 2002; MacInnes y Bossé 2004).

Activación de macrófagos alveolares e intravasculares principalmente a través de las toxinas Apx y LPS, conduce al lanzamiento de metabolitos tóxicos del oxígeno (incluyendo anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) así como enzimas proteolíticas y varias citocinas. La infección en cerdos conduce a una rápida producción local de citocinas pro-inflamatorias IL1 y IL-6. Si allí también hay un incremento significativo en TNF- α en el tejido pulmonar infectado no es claro (Sibille y Reynolds, 1990; MacInnes y Bossé 2004).

El daño a las células endoteliales por las toxinas Apx, así como la activación directa del factor XII por el LPS, inician la coagulación, fibrinólisis y los sistemas quinina. La activación de la cascada de la coagulación resulta en la activación de plaquetas y la formación de microtrombos, provocando isquemia y la necrosis subsecuente, caracterizando a la pleuroneumonía porcina aguda. Es más, los cerdos infectados con un mutante del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* que carecen de ApxI y ApxII pero con el LPS normal no desarrollaron la enfermedad clínica o lesiones significantes en los pulmones. Estas indicaciones de la contribución del LPS al desarrollo de la lesión puede ser mínima en ausencia de las toxinas Apx (Udeze et al., 1987; Bertram, 1988; MacInnes y Bossé 2004).

El papel crítico de las toxinas Apx en el desarrollo de la enfermedad clínica y el daño a los tejidos puede ser confirmado usando toxinas recombinantes (rApxI, rApxII, rApxIII y rApxIV). La inoculación endobronquial en cerdos con cualquiera de las dos rApxI o rApxIII resulta en una enfermedad clínica severa y lesiones indistinguibles de éstas vistas en animales infectados agudamente. En contraste la inoculación con rApxII, solo o conjuntamente con el líquido filtrado de un cultivo agotado de toxinas Apx, resultó en poco o ningún signo clínico de la enfermedad solo una leve lesión en los pulmones (Frey, 1995; MacInnes y Bossé 2004).

Así, la ApxII aparece para contribuir solo mínimamente en la formación de la lesión, a pesar del hecho que el serotipo 7, el cual produce solo ApxII, es capaz

de causar una enfermedad severa con las típicas lesiones pulmonares. Además, los mutantes del serotipo 1 y 5, están desprovistos de ApxI pero aún produce ApxII, así causan la típica enfermedad clínica severa y lesiones pulmonares. Estos resultados indican que puede ser otras toxinas asociadas a células o factores de virulencia que contribuyen a la severidad de las lesiones pulmonares causadas por estas cepas (Reimer, et al., 1995; MacInnes y Bossé 2004).

Recientemente, la cuarta toxina RTX (ApxIV) se ha reportado que la producen todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* esta toxina es antigénicamente distinta a las otras toxinas Apx y solo se produce *in vivo*. *Escherichia coli* expresa una Apx clonada asociada contra la corriente del ORF se encontró que es débil en actividades hemolíticas y cohemolíticas (CAMP) (Schaller et al., 2000).

EPIDEMIOLOGÍA

Existen en la actualidad 15 serotipos o “variedades” de la misma bacteria. Sin embargo, no tienen todos los serotipos el mismo poder patógeno. En América, los serotipos más comúnmente aislados de casos clínicos son el 1, 5 y 7. Más específicamente en Canadá, los serotipos 5 y 7 han aumentado su frecuencia en

los últimos años de modo considerable, mientras que se observan muchos menos casos debidos al serotipo 1 (Gottschalk et al., 2003; Gottschalk y Taylor 2006).

Tabla 3: Distribución de los distintos serotipos aislados en Canadá (casos clínicos) en los últimos años

Año	Cantidad de aislamientos	Porcentaje correspondiente a cada serotipo				
		1	5	7	3-6-8	Otros
1990	473	60	26	8	4	2
1991	463	50	33	10	4	3
1992	317	40	38	17	2	3
1993	260	30	44	12	2	1
1994	255	37	45	15	1	1
1995	303	28	52	14	3	3
1996	215	22	51	24	2	1
1997	190	20	44	32	2	2
1998	220	27	37	29	5	2
1999	242	25	35	35	4	0
2000	340	20	40	30	8	2
2001	380	21	37	31	8	3
2002	320	18	35	30	12	5
2003	280	15	38	28	14	5
2004	286	16	35	29	15	5

Todos los serotipos, con la excepción de los serotipos 9, 11 y 14 fueron aislados en América. Los serotipos 2, 3, 6, 8, 10 y 12 son detectados ocasionalmente de casos clínicos. Una cepa extremadamente infectiva de App serotipo 6/8 ha sido diagnosticada en los últimos años en USA y Canadá. Dicha cepa produce ciertos signos clínicos y lesiones, con una seroconversión extremadamente elevada (alta producción de anticuerpos). El serotipo 15, que había sido descrito solo en Australia, es detectado en Canadá y USA de modo casi rutinario. La presencia de reacciones cruzadas fuertes entre los serotipos 3, 6, 8 y 15 impedían su correcta identificación. Una cepa parecida se encontró en Brasil últimamente. La distribución de serotipos cambia según el país y en el continente en el que dicho país se encuentra (Gottschalk et al. 2003; Gottschalk y Taylor 2006).

Tabla 4: Distribución geográfica de los distintos serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en distintos países

País	Serotipos prevalentes	Serotipo(s) dominante(s)
Argentina	1, 2, 3, 5,7, 12	1 ,5
Australia	1, 2, 3, 7, 12	1
Bélgica	2, 3, 6, 7, 8, 9, 11	3
Brasil	1, 3, 5, 7	1,5, 3

Canadá	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12,13	1,5, 7
Chile	1, 5	1, 5
Croacia	2, 7, 8, 9	2, 9
Checoslovaquia	1, 2, 7	2
Dinamarca	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12	2
Francia	2, 3, 7, 8, 9	9
Alemania	2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10	9, 2, 7
Hungría	1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12	3, 2, 7
Italia	1, 2, 3, 4, 5, 7	5
Irlanda	3	3
Japón	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12	1, 2
Corea	2, 3, 5, 7	5, 2
<i>México</i>	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8	1, 5
Países Bajos	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11	2, 9, 11
Noruega	2	2
Polonia	1, 2, 5, 9	1, 9
España	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12	4, 7, 2
Suecia	2, 3, 4	2
Suiza	2, 3, 7, 9	2
Taiwán	1, 2, 3, 5	1, 5
Gran Bretaña	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10	2, 3, 8
USA	1, 3, 5, 7, 8, 12	1, 5, 7
Venezuela	1, 7, 2, 3, 6	1

Datos de pocos países de América Latina han sido publicados, entre ellos, los de Argentina, Chile, Brasil y **México**. En general, en esos países, los serotipos 1 y 5 son los más comúnmente aislados de casos clínicos. En Europa, los

serotipos 2 y 9 son los más virulentos. En América del Norte, las granjas de alto nivel sanitario pueden en ciertas ocasiones ser libres de todos los serotipos de App, mientras que la mayoría de las granjas convencionales están infectadas con algunos o varios de los serotipos de baja patogenicidad. (Gottschalk et al. 2003; Gottschalk y Taylor 2006).

MÉTODOS DE DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS BACTERIANAS Y LA IMPORTANCIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE LOS SEROTIPOS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN MÉXICO.

El diagnóstico definitivo de las enfermedades respiratorias del cerdo, en las que se incluyen; Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, PCP; Neumonía Enzootica, NE; Pasteurelosis Pulmonar, PP y Enfermedad de Glasser, EG, deben ser oportunos y rápidos y es esencial para identificar a *Mycoplasma hyopneumoniae* y a los diferentes serotipos y tipos prevalentes de *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Pasteurella multocida* y *Haemophilus parasuis* prevalentes en las zahúrdas y en las granjas, así como en las diferentes zonas porcícolas del país, ya que permite utilizar y/o elaborar los biológicos/reactivos adecuados para el diagnóstico, así como los biológicos para la inmunización de los animales susceptibles (Fenwick y Henry 1994; Sebunya y Saunders, 1983; Gottschalk,1998). En México, así como en los países latinoamericanos, el diagnóstico de las enfermedades respiratorias bacterianas lo llevan a cabo de la siguiente manera:

a) Observación de los signos clínicos en el cerdo y en los de la zahúrda, este método no es confiable, además no identifica al serotipo involucrado en la signología ya que solo los signos clínicos que se presentan en cursos agudos de las afecciones respiratorias, permiten identificar a la pleuroneumonía, y solo se reflejan en los parámetros de la Ganancia Diaria de Peso (GDP) y Conversión Alimenticia (CA).

b) Observación de las lesiones a la necropsia de los animales muertos de los casos agudos o durante la inspección de las canales, en los centros de abasto de los casos crónicos. Para el estudio patológico se requiere de los servicios de un Médico Veterinario especialista en Patología, y aunque algunas lesiones son propias de la PCP, sin embargo no podemos identificar a los serotipos prevalentes en las zahúrdas de una misma granja.

c) Aislamiento, identificación y tipificación de los microorganismos presentes en los pulmones de los cerdos con problemas agudos o bien crónicos. Este proceso tarda de 48 a 72 horas en el mejor de los casos, como sería con *A. pleuropneumoniae*, para realizar estas técnicas es necesario contar con un laboratorio bien establecido, en donde además de contar con los reactivos, medios de cultivo y antisueros conocidos, se requiere del personal calificado, y en México existen pocos laboratorios que brindan este servicio (Fenwick y Henry 1994; Sebuya y Saunders, 1983; Gottschalk, 1998).

d) El diagnóstico serológico se lleva a cabo en los cerdos vivos de las granjas o en los cerdos en los centros de abasto. El método serológico es uno de los más adecuados, ya que se puede realizar en los animales vivos con y sin signos clínicos, no requiere del sacrificio de los cerdos, es más rápido y nos permite hacer perfiles de la enfermedad, identificando el punto de infección en la granja, además permite identificar los serotipos prevalentes. Para el diagnóstico serológico de la PCP (Fenwick y Henry 1994; Sebunya y Saunders, 1983; Gottschalk, 1998). Se encuentran algunas pruebas tales como; aglutinación, aglutinación con partículas de látex, aglutinación lenta en tubo; aglutinación lenta en tubo con 2-mercaptoetanol, hemoaglutinación indirecta, fijación de complemento y ELISA entre otras. Pocas de estas pruebas se realizan en México, y las que se utilizan son más para estudios de investigación que para diagnóstico, debido principalmente a la falta de infraestructura, equipo, y personal capacitado, que solo los laboratorios de las Universidades e Institutos cuentan (Ciprián et al., 1990; Ciprián, 1999). En el caso de PCP se ha determinado en sus etapas iniciales que el serotipo predominante de *A. pleuropneumoniae* es el serotipo 1 (Ciprián et al., 1988).

La problemática acerca de la PCP expuesta anteriormente motivo a los autores (Ciprián et al., 1988; Ciprián et al., 1990; Colmenares et al., 1992; Mendoza et al., 1992 y Torres et al., 1992) de este trabajo al desarrollo de un paquete tecnológico diseñado para elaborar a nivel industrial KITS de diagnóstico serológico de la PCP,

empleando tecnología sencilla y de bajo costo; paquete tecnológico denominado PLEUROTEST^{mr} App; -Pm; -Mh; -Hps (mr: marca registrada por la UNAM), que permitirá conocer la situación de la granja con respecto a la enfermedad, permitirá conocer mediante los perfiles serológicos los puntos de infección o las ventanas inmunológicas y así poder establecer las medidas de control necesarias (Haesebruck, et. al.,1997; Ciprián et al., 1999).

CONTROL DE LA ENFERMEDAD MEDIANTE LA VACUNACION

BACTERINAS A NIVEL MUNDIAL

En los últimos años se ha venido insistiendo repetidamente en la vacunación, en la creencia de que una buena vacuna será decisiva en el control. Desde los productos biológicos más antiguos hasta los productos más recientes, se han experimentado diversidad de combinaciones, en las que algunos factores de virulencia, especialmente las Apx, han centrado el interés. Pese a todo, aún se carece de un producto que proteja frente a la enfermedad aguda y prevenga la condición de portador crónico y eliminador de *A. pleuropneumoniae*. (Rodríguez et al., 2002).

Bacterinas de cuerpo completo.

Muchas bacterinas incluyen el microorganismo completo, del serotipo predominante en la explotación o en la región, inactivado por formol al 0.2%. La concentración oscila en torno a 10^9 - 10^{10} UFC/ml., se añade un adyuvante que refuerza la respuesta inmune. Por lo general y dependiendo del laboratorio productor de biológicos, se elabora un calendario de vacunación, que por lo general se administra una dosis a las 9 semanas o coincidiendo con la entrada de los animales en la explotación y, al menos una repetición a las 2-3 semanas (Christensen, 1982; Rosendal, et al. 1981).

En este tipo de productos la protección sólo es homóloga, por lo que se suele incorporar más de un serotipo, por ejemplo, mezclas de los serotipos 1 y 5; 2 y 5; 1 y 7; 2, 7 y 9; 4 y 2. Las bacterinas reducen la gravedad y la mortalidad, pero no resuelven el problema de la prevención ni la persistencia de lesiones o la presencia de portadores.

Bacterinas de extractos celulares.

Los extractos de cultivos son una alternativa a las bacterinas (Espuña, et al, 1986; Kume y Nakai, 1988). Se han utilizado extractos crudos de cultivos jóvenes, concentrados o no, en ocasiones precipitados con polietilenglicol o cetavión (para la cápsula), conjugados con Apx, LPS y carbohidratos y, por lo general, con adyuvantes, aunque en general solo han reducido la mortalidad o las lesiones,

pero no resolvieron el problema de los portadores (Fedorka-Cray, et al. 1990; Hesse, et al. 1984).

Bacterinas atenuadas

Se han obtenido distintos mutantes atenuados con los que se ha inducido inmunidad protectora, como la cepa CM5 del serotipo 1 (Rosendal y MacInnes, 1990), o la cepa BES (Utrera, et al., 1990), pero solo se han conseguido descensos en la mortalidad y lesiones. También se han obtenido mutantes acapsulados, atenuados por mutagénesis química, de los serotipos 1 y 5 (Inzana, et al., 1993), que han sido estudiadas en condiciones experimentales y, según su autor, una dosis de 2×10^9 UFC indujo una fuerte respuesta capaz de resistir el desafío intratraqueal, tanto del serotipo homólogo como heterólogos, sin síntomas ni lesiones. Otros autores han trabajado con mutantes auxotróficos (biosíntesis de riboflavina) sugiriendo, también, su valor como cepas vacunales (Fuller y Mulks 1995).

Bacterinas de subunidades

Muchos antígenos de superficie inducen respuesta sérica, por lo que han sido investigados desde el punto de vista antigénico-inmunogénico y vacunal (Rodríguez et al., 2002). Es el caso del LPS, que se ha utilizado detoxificado y en adyuvante con resultados protectores, aunque inferiores a los conseguidos con una bacterina (Rioux, et al., 1998). Algunas OMP del serotipo 5 en adyuvantes

también fueron investigadas (Rapp y Ross, 1986) obteniendo un descenso significativo en el número de casos de neumonía, después de la infección intranasal con la cepa homóloga (Rapp y Ross, 1986; Rapp y Ross, 1988).

La cápsula, igualmente, ha sido estudiada desde el punto de vista vacunal. Lenser et al. (1988) estudiaron polisacáridos y proteínas de la cápsula, a partir de sobrenadantes de cultivo de los serotipos 5 y 7, precipitados con cetavión y mezclados con un adyuvante oleoso. Todos los ratones inmunizados intraperitonealmente sobrevivieron a la infección con el serotipo homólogo, pero no con el heterólogo.

Toxoides

Las toxinas Apx se consideran inmunógenos muy importantes frente a los que se forman anticuerpos neutralizantes en el suero de cerdos convalecientes (Bendixen et al., 1981; Frey et al., 1989) o inmunizados artificialmente (Bossé et al., 1992).

Se ha descrito el uso vacunal experimental (en el ratón) de Apx-I recombinante en *E. coli* y de la Apx-II purificada del serotipo 7, en adyuvante de hidróxido de aluminio, obteniéndose resultados protectores frente a algunos serotipos, pero no frente a otros (Rodríguez et al., 2002).

En la actualidad se comercializa una vacuna de subunidades con tres toxoides de Apx-I, Apx-II y Apx-III y una OMP (Martelli et al., 1996) con adyuvante oleoso. Se han descrito buenos resultados cuando se comparan con los controles, pero el problema aún sigue sin resolverse de modo definitivo (Rodríguez et al., 2002).

Bacterinas conjugadas.

Se ha estudiado (Fenwick y Osburn, 1986) una vacuna de oligosacáridos de la pared celular conjugados con un toxoide tetánico, comprobándose que los polisacáridos desempeñan un papel significativo en la inmunidad.

Se ha desarrollado una vacuna conjugada que combinaba, en distintas opciones, la Apx-I de los serotipos 1 ó 5b con OMP del serotipo 1 y un adyuvante, con excelentes resultados de mortalidad, pero no en el desarrollo de lesiones (Prideaux, et al., 1999).

También se ha estudiado la mezcla de polisacárido capsular con hemolisina o su conjugación con el LPS (Fenwick y Osburn, 1986), produciéndose un aumento significativo del título de anticuerpos, con descenso de la mortalidad y lesiones, pero el producto no resolvió satisfactoriamente el control.

Se han utilizado dos antígenos recombinantes del serotipo 7, que incluían el extremo C-terminal de la Apx-II y una Tbp de 60 kDa (Rossi-Campos et al., 1992).

En todos los casos, todos los animales desarrollaron una fuerte respuesta humoral, comparable a la que se inducía en la infección natural, con una menor mortalidad y afectación que los controles, pero solo frente a la exposición con el serotipo homólogo (Rodríguez et al., 2002).

Por último, ha sido descrito una vacuna preparada a base de antígenos asociados a células recombinantes, así como antígenos secretados, entre ellos, proteínas de unión a transferrina y la toxina Apx-II (Rodríguez et al., 2002). El preparado ha sido contrastado frente a la inoculación endobronquial del serotipo 9, con resultados de protección aceptables (Van Overbeke et al., 2001).

INICIOS DE LAS BACTERIAS CONTRA LA PLEURONEUMONIA CONTAGIOSA PORCINA EN MÉXICO

Desde mediados de los años setentas, las infecciones respiratorias causadas por *A. pleuropneumoniae* (antes *H. pleuropneumoniae*) han sido reconocidas como un factor limitante en la producción porcina intensiva. Los primeros reportes que se tienen de la enfermedad en México son las descripciones clínicas del problema por Ramírez Necochea en 1976, mientras que los aislamientos y estudios exhaustivos del microorganismo fueron realizados por Pijoan et al (1978) durante los brotes originales ocurridos en Tlaxcala, Pénjamo y La Piedad y a partir de entonces no existe cuenca porcina del país en donde no se

haya registrado la enfermedad, en aquellos años no había inmunógenos comerciales y el tratamiento y control se llevaba a cabo con antibióticos como la estreptomicina, ampicilinas y sulfonamidas que parecían ser eficaces (Ramírez y Pijoan 1982).

A partir de estos brotes de empezaron a producir biológicos con la finalidad de controlar la enfermedad y consistieron en introducir a la bacterina con los biotipos A (colonias grandes) y B (colonias chicas) que fueron determinados en base a su tamaño y a su mayor o menor dependencia al NAD (Ochoa y Pijoan. 1978).

En un estudio sobre la efectividad de una bacterina de *A. pleuropneumoniae* (antes *H. pleuropneumoniae*) con los biotipos A y B, en donde los resultados mostraron que en animales expuestos en forma natural, se protegieron al 100%, mientras que los animales desafiados con *A. pleuropneumoniae* vivos solo se protegieron el 80% (Arizpe, Ochoa y Pijoan, 1978).

En otro trabajo y con un diseño experimental con varios grupos de cerdos, en donde evalúan la respuesta inmune tanto humoral como celular, utilizando la misma bacterina de *A. pleuropneumoniae* (antes *H. pleuropneumoniae*) biotipos A y B, en dos esquemas de vacunación y revacunación y posteriormente desafiados con *A. pleuropneumoniae* vivos encontraron serologías positivas con la prueba de aglutinación y porcentajes elevados con la prueba de MIF, lo que sugiere una respuesta mixta y paralela, los autores sugieren la revacunación para controlar los

brotos de pleuroneumonía contagiosa porcina en las explotaciones porcícolas (Cruz y Martínez, 1980).

Las vacunas que se fabricaron inicialmente contra la pleuroneumonía frecuentemente fallaban al tratar de conferir protección suficiente contra la enfermedad además de ser útiles solo contra el serotipo específico para el cuál eran preparadas. La mayoría consistía de células bacterianas completas inactivadas con calor o formaldehído (Nielasen, 1984; Nielasen, 1985).

Recientemente aparece una nueva generación de vacunas su unitarias compuestas de de las tres principales exotoxinas de la Familia RTX (Api, Api y Apia) y una proteína de membrana externa de 42 KDa que ha mostrado que protege contra doce serotipos (1 al 12) (Frey, 1995; van den Bosch y Frey, 2003).

JUSTIFICACION

En la actualidad existen en el mercado otro tipo de vacunas que combinan bacterinas y toxoides como la vacuna Ingelvac Apx o bien como la vacuna subunitaria producida por Intervet, que se han utilizado con mejores resultados, sin embargo, estas siguen utilizando la vía de administración intramuscular o subcutánea lo cual implica la necesidad de personal especializado para su aplicación y pueden además ocasionar daños al tejido del animal. El desarrollo de métodos de inmunización oral podría por tanto ser de suma importancia para el control de esta enfermedad (Potter et al., 1996; Bagdasarian, et al., 1998; Huter et al., 2000).

En la FES-Cuautitlán, UNAM se ha trabajado y patentado con un desarrollo tecnológico denominado “Proceso para elaborar un Toxoide-inmunógeno de *A. pleuropneumoniae* para la prevención de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina”. El desarrollo tecnológico consistió en cultivar, preparar, purificar y concentrar las toxinas (Apx I, Apx II y Apx III) de *A. pleuropneumoniae* a partir de los serotipos 1, 3, 5 y 7. Determinar hemolítica y citolítica de cada uno de los grupos (A, B, y C). E inactivar y preparar los toxoides (que se dará a conocer con el nombre de PLEUROTOXOIDE A, B, y C). Finalmente los inmunógenos se validaron en granjas con problemas de pleuroneumonía contagiosa porcina. La patente consistió en que los sobrenadantes de *A. pleuropneumoniae* se ha detectado y encontrado actividad hemolítica. La toxina se inactiva por medio de formaldehido y

por las enzimas proteolíticas. Esta toxina está presente en los serotipos 1, 5, 9, 10, 11 y 12. La actividad toxica de esta proteína es la responsable de las lesiones iniciales de la PCP, caracterizadas por ser hemorrágicas y necróticas. Otra toxina de un peso molecular de 103 Kd se ha encontrado en los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 y 15 se identifica como hemolisina o citolisina 2 (Apx II: poco hemolítica y moderadamente citotóxica). Solo el serotipo 10 produce la ApxI, mientras que los serotipos 7 y 12 la ApxII. Estas hemolisinas no muestran diferencias antigénicas entre serotipos, aunque son antigénicamente diferentes entre ellas. Otra exotoxina tiene un peso molecular de 120 Kd y se le conoce con el nombre de Apx III, no es hemolítica pero es fuertemente citotóxica, sin embargo, también se le conoce con el nombre Pleurotoxina (PTX), los serotipos que la producen son los siguientes 2, 3, 4, 6 y 8. (Patente: No. PA/a/1998/009690).

Por los antecedentes anteriores, y el papel que juegan los diferentes antígenos de *A. pleuropneumoniae* y sus productos extracelulares, la idea de tener un solo inmunógeno, que permitiría por su contenido proteger contra la mayoría de los serotipos presentes en México. Los serotipos presentes son: 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8, y basándose en la presencia de las Apx que excretan estos serotipos se podría diseñar una bacterina que cubriera los requisitos de evitar la muerte y el grado de lesiones neumónicas.

OBJETIVO GENERAL:

Demostrar que en cerdos previamente inmunizados con una bacterina/toxoide de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sobreviven al desafío experimental homólogo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Preparar el inmunógeno con los serotipos 1, 2, 3, 4 y 5 de *A. pleuropneumoniae*.
2. Evaluar la inocuidad de la bacterina/toxoide en cerdos.
3. Evaluar la inmunogenicidad de la bacterina/toxoide en cerdos.
4. Evaluar la potencia en cerdos desafiados previamente inmunizados con la bacterina/toxoide.
5. Evaluar las lesiones macroscópicas pulmonares ocasionadas por *A. pleuropneumoniae* de los cerdos.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIALES

Material de laboratorio:

Asa bacteriológica.

Barra magnética.

Cajas petri desechables (SyM®).

Celdas para espectrofotómetro.

Espátulas.

Filtro metálico mediano.

Frascos de vidrio estériles.

Jeringas desechables sin aguja de 10 ml (PLASTIPAK®).

Matraces Erlenmeyer (PYREX®) con taparrosca de baquelita de 250 ml.

Matraces Erlenmeyer (PYREX®) con taparrosca de baquelita de 500 ml.

Matraz aforado de 100 ml (KIMAX®).

Matraz Erlenmeyer (PYREX®) de 1000 ml.

Mecheros Bunsen y mangueras de látex.

Membranas (millipore®) (0.45 y 0.22 μm).

Micropipeta de 2 a 10 μl (Oxford®).

Micropipeta de 40 a 200 μl (Oxford®).

Micropipeta de 1000 μl (Volac Ultra).

Microplacas de 96 pozos de fondo plano (GREINER BIO – ONE®).

Palillos estériles.

Pipetas desechables de 1 y 5 ml (GREINER BIO - ONE®).

Portaobjetos.

Puntas desechables para micropipetas.

Tubos capilares.

Tubos para centrifuga de 50 ml estériles (GREINER BIO - ONE®).

Vasos de precipitados (KIMAX®) de 100 y 250 ml.

Material biológico:

Cepas ATCC de serotipos 1 al 10 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*:

Serotipo	Cepa de referencia
1	4074
2	1536
3	1421
4	M62
5	K17

Cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* Cowan 1.

Sangre bovina desfibrinada.

Equipo

Congelador (American).

Refrigerador (American).

Balanza granataria (Triple beam balance 700 series).

Balanza analítica.

Parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate).

Autoclave (All American Modelo 1925X).

Estufa bacteriológica (Riossa).

Microscopio óptico (OLYMPUS® CH2).

Estufa orbital (NEW BRUNSWICK® serie 25).

Espectrofotómetro (COMPUR M® 2000 CS).

Centrifuga con control de temperatura (DAIMON® DPR 6000).

Lector de ELISA

Equipo de filtración tangencial Millipore/filtros (Pellicon).

Reactivos

Reactivos de tinción de Gram (cristal violeta, lugol, alcohol –acetona y safranina).

Peróxido de Hidrógeno.

Discos para prueba de oxidasa.

Medio BHI (BD® Bioxon).

Agar – Agar (MERCK®)

Medio Agar base sangre (MERCK®).

Medio Nuevo.

Glucosa (MERCK®).

NAD (Research Organics®).

Solución salina al 0.9 %.

Sangre bovina desfibrinada.

Agua destilada.

Formaldehido (CHEMICAL KEERNAR®).

REHIGRAGEL-LV Gel de hidróxido de aluminio baja densidad al 3% (Reheis Company).

Vacutainer (Becton Dickinson and Company).

Solución amortiguadora PBS/Twen-20 0.05%

Skim-milk al 5 %

Anti-IgG de cerdo peroxidada diluido 1:10,000 (SIGMA CHEMICAL, USA)

Sustrato de la enzima OPD (orto-fenilendiamina en amortiguador de citrato + Peróxido de hidrogeno al 30 %)

Ácido sulfúrico 4N

METODOLOGÍA

Preparación de medios de cultivo

Para las diferentes etapas del experimento: reactivación del serotipo, Prueba de satelitismo cepa nodriza *Staphylococcus aureus*, dependencia del factor V (NAD), fenómeno de CAMP y curva de crecimiento y cuenta viable en placa, se prepararon medios líquidos y sólidos (Shope, 1964; Nicolet, 1968; Killian et al., 1978; Ochoa y Pijoan 1978; Kilian et al. 1978)

Medios sólidos

Agar BHI/Sangre:

Agar base sangre (Merck)	37.0 g
Sangre bovina desfibrinada	50.0 ml
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

Agregar a 1000 ml de agua destilada la base de agar sangre; evitando que la solución alcance la temperatura de ebullición del agua, disolverlo en calor auxiliándose con una barra magnética y una parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate). Esterilizar en Autoclave (All American Modelo 1925X) a una temperatura de 121°C, 15 lb. por 15 minutos. Dejar que la solución se enfríe hasta llegar a una temperatura de 45°C para agregar la sangre bovina. Vaciar el medio en cajas Petri desechables (SyM). Esperar que gelifique el agar y conservar en refrigeración.

Agar BHI:

Medio BHI (BD® Bioxon)	37.0 g
Agar – agar (MERCK®)	20.0 g
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

Disolver en calor el BHI (BD® Bioxon) y agar – agar (MERCK®) en el agua destilada, utilizando una barra magnética y una parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate). Esterilizar en Autoclave (All American Modelo 1925X) a una temperatura de 121°C, 15 lb. por 15 minutos. Vaciar el medio en cajas Petri desechables (SyM). Esperar que gelifique el agar y conservar en refrigeración.

Agar BHI / NAD

Medio BHI (BD® Bioxon)	37.0 g
Agar – agar (MERCK®)	20.0 g
NAD al 0.5 % (Research Organics)	2.0 ml
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

Disolver en calor el BHI (BD® Bioxon) y agar – agar (MERCK®) en el agua destilada, utilizando una barra magnética y una parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate). Esterilizar en Autoclave (All American Modelo 1925X) a una temperatura de 121°C, 15 lb. de presión por 15 minutos. Al enfriarse un poco el medio, agregar el NAD (Research Organics). Vaciar el medio en cajas Petri desechables (SyM). Esperar que gelifique el agar y conservar en refrigeración.

Medios Líquidos

Caldo BHI / NAD

Medio BHI (BD® Bioxon)	37.0 g
NAD al 0.5 % (Research Organics)	2.0 ml
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

Disolver el medio en calor usando una parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate) y una barra magnética. Esterilizar en Autoclave (All American Modelo 1925X) a una temperatura de 121°C, 15 lb. por 15 minutos. Conservar en refrigeración.

Actinobacillus pleuropneumoniae

Los serotipos ATCC del 1 al 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* fueron proporcionados por el laboratorio “Enfermedades Respiratorias del Cerdo” en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, los cuales se encontraban suspendidos en una sustancia crioprotectora contenida en crioviales y sumergidos en Nitrógeno líquido para su conservación.

NOTA: La metodología siguiente fue realizada para cada uno de los serotipos del 1 al 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Reactivación de la cepa bacteriana

Cada uno de los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* fue descongelado en baño María a 37°C y finalmente se mantuvo a temperatura ambiente. Con ayuda de un asa bacteriológica, previamente flameada, se tomó una muestra del serotipo presente en el criovial y se sembró por la técnica de dilución en tres placas de agar BHI enriquecido con NAD. Se dejó incubar en la estufa bacteriológica (Riossa) a 37°C por 18-24 horas.

Aislamiento e identificación.

Los cinco serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que se aislaron se identificaron principalmente por la dependencia al NAD; por la presencia de hemolisis y al fenómeno de CAMP, utilizando medios de BHI con y sin sangre de bovino desfibrinada al 5.0%, y cultivos con y sin la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* (Shope, 1964; Nicolet, 1968; Killian et al., 1978; Ochoa y Pijoan 1978; Kilian et al. 1978; Frey et al., 1989; Gottschalk, 1998; Frey et al. 1994; Jansen et al. 1995; Frey 2003).

Cantidad de medio de cultivo para preparar un lote de BactTox de 1 litro.

Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPO 1: 200 ml

Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPO 2: 200 ml

Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPO 3: 200 ml

Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPO 4: 200 ml

Actinobacillus pleuropneumoniae SEROTIPO 5: 200 ml

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>					
SEROTIPO		TOXINAS			%
1	ApxI (+)	ApxII (+)	ApxIII (-)	20	
2	ApxI (-)	ApxII (+)	ApxIII (+)	20	
3	ApxI (-)	ApxII (+)	ApxIII (+)	20	
4	ApxI (-)	ApxII (+)	ApxIII (+)	20	
5	ApxI (+)	ApxII (+)	ApxIII (-)	20	
TOTAL				100	

Inactivación.

El cuerpo bacteriano y los sobrenadantes se inactivaron con formaldehído al 4% agregándolo lentamente en agitación continua.

Adyuvante.

Se utilizó el adyuvante de hidróxido de aluminio Rehidragel al 3% (permite una liberación más lenta de los antígenos, garantizando así una mejor respuesta inmunológica).

Inmunógeno Comercial.

Se utilizó un toxoide comercial (ToxCom) constituido por las Apx I, II y III inactivadas y una proteína de membrana externa de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Diseño experimental

Animales.

Se utilizaron 16 cerdos de cinco semanas de edad, de raza Yorkshire (PIC), libres de anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Pasteurella multocida*; Enfermedad de Aujeszky y PRRS. Durante todo el experimento los animales se alimentaron con alimento libre de antibióticos. Se formaron cuatro grupos de 4 cerdos cada uno de ellos. Grupo A: Control (-) no vacunado y no desafiado; Grupo B: Control (+) no vacunado y desafiado; Grupo C: ToxCom vacunado dos veces a intervalo de 15 días y desafiado; Grupo D: BactTox vacunado dos veces a intervalo de 15 días y desafiado.

Grupos	No. De animales	Bacterina	Desafío
Grupo A (Control -)	4	-	+
Grupo B (Control +)	4	-	+
Grupo C (ToxCom)	4	+	+
Grupo D (BactTox)	4	+	+

Inmunización.

El primer día del experimento se realizó la primera vacunación en los grupos C y D, cada animal de dichos grupos se inoculó con 2.0 ml vía intramuscular del inmunógeno correspondiente. A los quince días se repitió la inmunización en estos animales a la misma dosis y por la misma vía.

Sangrados.

El primer día del experimento se tomaron muestras sanguíneas con Vacutainer de la vena cava anterior en todos los animales de los 4 grupos. Se repitió el mismo procedimiento cada 7 días hasta obtener 4 sangrados. Esto se realizó para llevar a cabo las pruebas de ELISA.

Prueba de ELISA.

La prueba serológica de ELISA ya estudiada por otros autores (Lenier et al., 1999; Nielsen et al., 2000) se realizó de acuerdo a la metodología de López et al., (2008), en donde se preparó primero un cultivo de los serotipos 1 y 3 para obtener los sobrenadantes con las toxinas Apx I, II y III; a partir de los sobrenadantes se procedió a ultrafiltrarlos, para así en los retenidos tener la concentración de las tres toxinas.

Preparación del antígeno.

Los serotipos 1 y 3 de App fueron descongelados en baño María a 37°C y finalmente se mantuvo a temperatura ambiente. Con ayuda de un asa bacteriológica, previamente flameada, se tomó una muestra del serotipo presente en el criovial y se sembró por la técnica de dilución en tres placas de agar BHI enriquecido con NAD. Se dejó incubar en la estufa bacteriológica (Riossa) a 37 ° C por 10-12 horas. Posteriormente los serotipos purificados fueron sembrados en BHI líquido enriquecido con NAD al 0.5% y se incubaron a 37°C durante 8 horas.

Purificación del antígeno.

Se eliminó la biomasa por centrifugación a 5000 RPM durante 30 minutos, conservando el sobrenadante. La filtración del sobrenadante se realizó con una membrana de 0.22 μm para tratar de eliminar los restos de cuerpo bacteriano. La filtración de flujo tangencial se realizó con una membrana de 100 kDa. En la filtración tangencial el flujo del fluido no se dirige en forma directa contra el filtro, se dirige de manera tangencial, evitando que el filtro se sature y permitiendo además tener un proceso alterno de concentración (Equipo de filtración tangencial Millipore/filtros Pellicon).

Después de la filtración de flujo tangencial el sobrenadante quedó dividido en dos fracciones, un sobrenadante retenido que contiene las moléculas de un peso mayor a 100 kDa en donde se encuentran las toxinas Apx. Cuyos pesos moleculares son de 103 kDa para Apx I; de 105 kDa para Apx II y 120 kDa para Apx III y un sobrenadante permeado que contiene las moléculas con un peso menor, que fue utilizado sólo como control en posteriores procedimientos.

Se tomaron los retenidos para formar un pool con los dos serotipos y se determinó la concentración de proteínas.

Por el método de Bradford (Bradford et al., 1976) se determinó la cantidad de proteína en el retenido utilizando 100 μl del sobrenadante y se le adicionó 1000 μl del reactivo de Bradford. Los tubos se dejaron en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 595 nm.

Preparación de las placas antigenadas.

Se utilizaron placas de poliestireno tratadas para pegar proteínas de 96 pocillos con fondo plano (SIGMA-ALDRICH USA: M 4034). El antígeno diluido se pegó a una concentración de 10 µg/ml utilizando solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.5. Se colocaron 100 µl de esta solución a cada pozo de la placa de ELISA, incubando durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó tres veces con 300 µl de una solución amortiguadora PBS/Twen-20 0.05% y se bloqueó durante 1 hora con skim-milk al 5 %. Después de lavar se agregaron los sueros problema diluidos 1:10 y se incubaron durante una hora. Se lavó 3 veces con solución amortiguadora PBS/Tween-20 y se agregaron 100 µl de anti-IgG de cerdo peroxidada diluido 1:10,000 (SIGMA-ALDRICH, USA). Se incubó una hora a temperatura ambiente. Después de lavar se agregó el sustrato de la enzima OPD (orto-fenilendiamina en amortiguador de citrato + Peróxido de hidrogeno al 30 %) a temperatura ambiente durante 10 minutos y la reacción se detuvo utilizando 50 µl de ácido sulfúrico 4N. Por último se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 492 nm.

Inóculo.

Se preparó un inóculo de los serotipos 1, 2, 3, 4, y 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a una concentración de 2.0×10^4 UFC.

Sistema de desafío por nebulización.

La aerosolización se llevó a cabo utilizando una cámara de nebulización (Sotres et al., 2007) con capacidad para 30 lechones de 16 kg. Cuenta con seis nebulizadores que producen un aerosol de un tamaño de partícula de 1.0 a 1.5 mm de diámetro. Se nebulizaron durante 45 minutos con 36 ml de inóculo a un título de cada uno de

los serotipos de 2.0×10^4 UFC de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1, 2, 4, 3 y 5. (Lara et al., 2008)

De las figuras 1 a la 4 se observa la conformación de la cámara de nebulización que simula las condiciones de un desafío natural. La construcción de la cámara fue realizada en PTR de 1 ½ pulgadas en su estructura externa, para el forro de las paredes y el techo se utilizó lamina de acero inoxidable calibre 14 grado FDA, para el piso se utilizó lamina de acero inoxidable grado FDA calibre 12. Todo el proceso de soldadura se hizo con soldadura especial para acero inoxidable el sobre piso se formó con slats de resina plástica acordes para soportar pesos de $120\text{kg}/\text{cm}^2$, se siguió un diseño con las siguientes dimensiones: 2 metros / 2 metros / 1.60 metros adolado/altura), con una puerta/rampa de 1.50 metros de ancho por 1.20 de alto. Se colocó una sentina de acero inoxidable para el drenaje.

FIGURA 1.

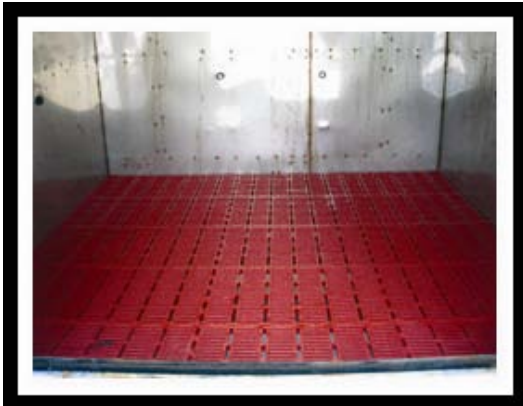


FIGURA 2.



FIGURA 3.



FIGURA 4.



FIGURA 5.



FIGURA 6.



FIGURA 7.



FIGURA 8.



En la paredes laterales y del fondo, exceptuando la frontal se hicieron perforaciones de 1 ½ pulgadas para colocar 6 nebulizadores desechables (Devilbiss) conectados a 6 equipos de nebulización médica de trabajo pesado (Devilbiss Pulmo Acid).

FIGURA 9.



FIGURA 10.



FIGURA 11.



En las figuras de la 9 a la 11 observamos los nebulizadores que se utilizaron, así como se colocaron los inóculos de *A. pleuropneumoniae* utilizando jeringas hipodérmicas (Lara et al., 2008).

Evaluación de los signos clínicos.

Temperatura.

Diariamente, a todos los cerdos se les tomó la temperatura vía rectal a la misma hora (8:00 a.m.) durante todo el experimento.

Signos clínicos.

Durante el manejo cotidiano se observaron los signos respiratorios de tos y/o disnea en agitación.

Sacrificio y Necropsia.

Se decidió sacrificar a todos los animales una vez que se inició las primeras muertes del Grupo Control (+). Los animales de los grupos restantes fueron sacrificados por electrochoque y exsanguinación.

La necropsia se realizo de acuerdo Aluja (1980) y consistió en lo siguiente:

Se realizó la inspección externa: se inspeccionan los orificios naturales buscando exudados, cambio de color y lesiones en las mucosas.

En la incisión primaria: En cerdos no se separa la piel del tejido subcutáneo.

Cortando de una vez piel y músculos, se separan las articulaciones coxofemorales y las escápulas. Siempre a través de la piel, se abre la cavidad bucal, dejando por el momento la lengua y demás estructuras en su lugar. Se procede a efectuar dos cortes, abarcando piel y músculos, del ángulo de cada rama de la mandíbula hasta la última costilla, siguiendo la línea de las articulaciones costocondrales. Con cuchillo se corta a través de éstas, pudiéndose levantar ahora todo el colgajo de piel, músculos, esternón, y fracciones de costillas. Se prolongan los cortes hechos sobre la cavidad torácica a cada lado de la cavidad abdominal, uniéndolos al llegar a la región pubiana. Se retira el colgajo totalmente y de esta manera están abiertas cavidades torácica y abdominal.

Faringe y laringe: Por medio de cortes paralelos a lo largo de la parte interna de las ramas del maxilar inferior se llega a la cavidad bucal y se extrae la lengua jalándola en dirección al cuello. Se desarticulan los huesos hioides, la laringe y faringe, así como las tonsilas y los linfonodos submaxilares, retrofaríngeos, parotídeos, y la glándula parotídea. Jalando la lengua hacia atrás, se cortan los músculos del cuello, a lo largo del trayecto de la tráquea. De este modo se liberan tráquea y esófago, unidos a la lengua y laringe, hasta la entrada de la cavidad torácica.

Cavidad torácica: Para constatar el vacío de la cavidad torácica, puede hacerse, antes de abrirla, una pequeña incisión en el diafragma, un cuyo momento se percibe un soplo característico cuando el aire entra a la cavidad, en este momento, se colapsan los pulmones sanos. Se revisan cambios en pleura, pulmones, líquido pleural. Al tirar de tráquea y esófago con la lengua, que ya se habían liberado anteriormente hacia atrás, se levantan los pulmones con el corazón y la parte torácica de la aorta, separando las adherencias pleurales a nivel de la columna vertebral. Se corta el esófago, aorta y cava.

Planimetrías

Los pulmones fueron removidos. Se midió la extensión de las lesiones neumónicas mediante planimetría de los diagramas pulmonares normalizados de vista dorsal y ventral. Se calculó el promedio del área ocupada por las lesiones neumónicas tomando como base el porcentaje del área total del pulmón y se realizó análisis estadístico por la prueba de “t” de Student ($p < 0.05$) (Ciprián et al., 1988). También se registró el aspecto de las lesiones neumónicas así como la presencia de adherencias en ellas.

Recuperación de los agentes inoculados.

Cada uno de los lóbulos caudales de los pulmones de los animales infectados fueron sembrados en medio de BHI con glóbulos rojos al 5% con cepa nodriza *Staphylococcus aureus* cepa Cowan I para observar la dependencia y el fenómeno de CAMP. Posteriormente los aislamientos en estos medios se resembraron en medios de BHI+NAD (0.001%) para su purificación (Kilian et al. 1978; Frey et al., 1989; Gottschalk, 1998; Frey et al. 1994).

Serotipificación de los aislamientos.

A partir de los 5 aislamientos en los medios de BHI+NAD, se cosecharon y se resuspendieron en PBS estéril para homogeneizarse a una concentración de 0.9835 DO. De esta suspensión se probaron con los antisueros de los serotipos 1, 2, 3, 4 y 5 (Gottschalk, 1998; Frey et al. 1994; Jansen et al. 1995; Frey 2003).

RESULTADOS

Reactivación de la cepa bacteriana.

Aislamiento.

Satelitismo

Todos los serotipos trabajados mostraron una dependencia por el factor V (NAD). Todos los serotipos de App crecieron en este medio, mientras que en agar BHI libre de NAD, no lograron desarrollarse.

En placas de agar sangre y BHI en donde se empleó la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* Cowan I se observó el fenómeno de CAMP.



Figura 12. Resultado de la Prueba de Satelitismo del S – 1 en placas de agar sangre y agar BHI.

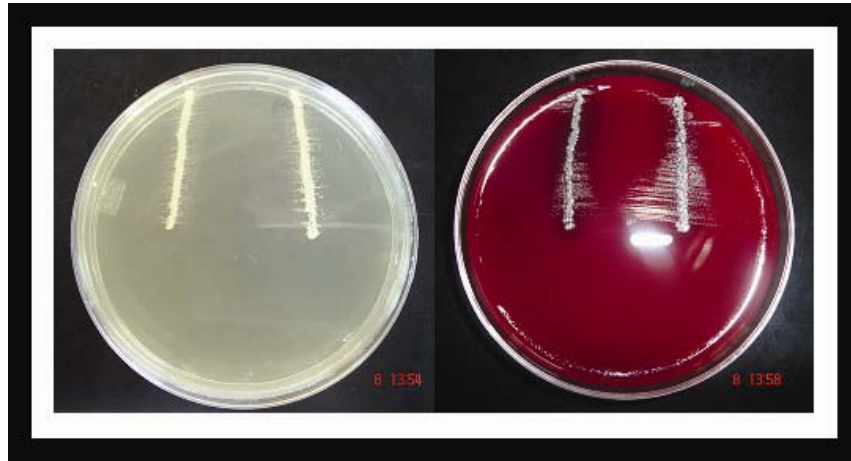


Figura 13. Resultado de la Prueba de Satelitismo en placas de agar sangre y agar BHI del S – 3.

Además, se observó la dependencia del factor V en placas de agar BHI suplementado con 1 μg / ml de NAD. Todos los serotipos de *App* crecieron en este medio, mientras que en agar BHI libre de NAD, no lograron desarrollarse.

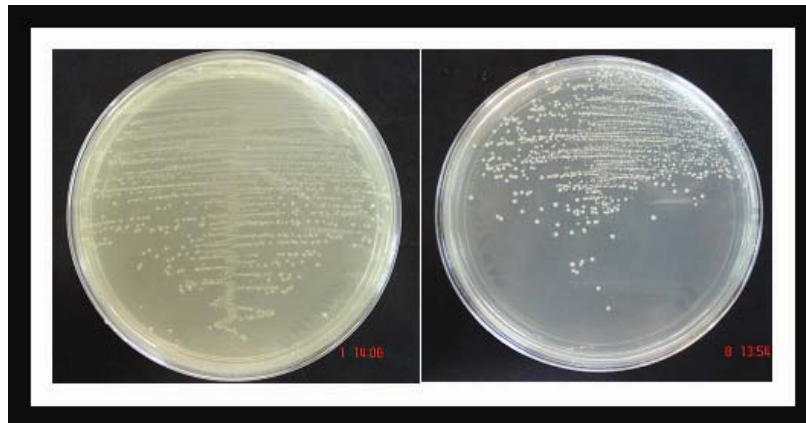


Figura 14. Resultados del requerimiento del factor V en placas de agar BHI / NAD de los S-1 y S-3.

IDENTIFICACIÓN DE App

Tinción de Gram

Se obtuvieron Bacilos y cocobacilos Gram (-) (0.3 x 1.5 µm), presentan pleomorfismo y pueden formar cadenas cortas.

Pruebas Bioquímicas

Tabla 5. Pruebas de Catalasa, Oxidasa, Oxidación – Fermentación de glucosa y motilidad practicadas a los actinobacilos recuperados.

APP	PRUEBA BIOQUÍMICAS PRIMARIAS			
SEROTIPOS	CATALASA	OXIDASA	O/F	MOTILIDAD
1	-	-	NT	-
2	-	-	NT	-
3	-	-	NT	-
4	-	-	NT	-
5	-	-	NT	-

Preparación del lote de BactTox

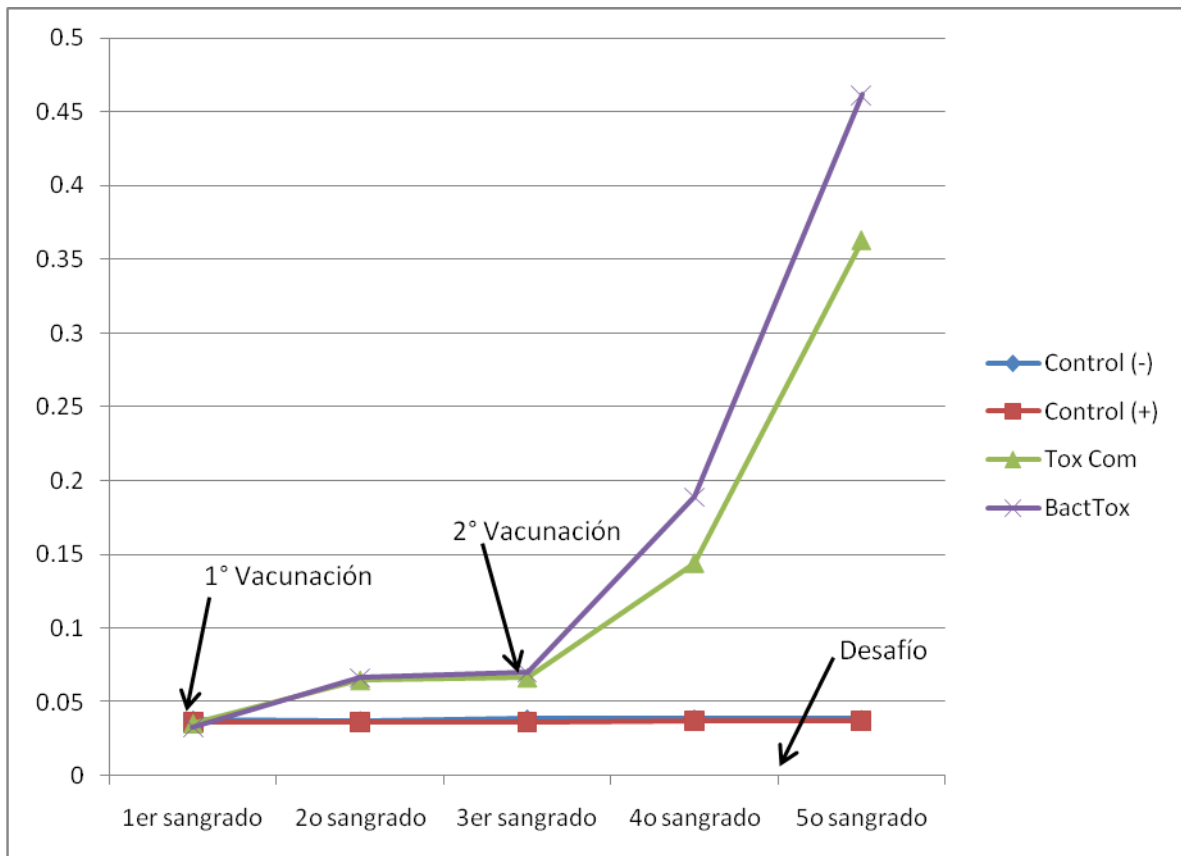
Ya identificados los serotipos de App, se cultivaron cada uno de los serotipos en forma individual en medio líquido de BHI suplementado con NAD; se detuvo el cultivo a las 12 horas de incubación. La biomasa y el sobrenadante de cada uno de los serotipos que se inactivaron con formaldehído al 4% y BactTox se ajustaron

al 20% con solución salina. BactTox en el adyuvante de hidróxido de aluminio Rehidragel al 3%.

Inmunización

En la primera vacunación, el grupo C: ToxCom presentó aletargamiento y anorexia sin hipertermia durante 24 horas. Mientras el grupo D: BactTox no presentó ninguna reacción tanto en el momento de la aplicación como en las horas posteriores. En la segunda vacunación realizada 15 días después de la primera inmunización, tanto el grupo C: ToxCom como el grupo D: BactTox no presentaron signología clínica.

FIGURA 15. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA PARA DETERMINAR LA INMUNOGENICIDAD DE LOS BIOLÓGICOS



En todos los sangrados el grupo A: Control (-) y el grupo B: Control (+) no presentaron ninguna lectura.

En la primera vacunación el comportamiento serológico fue similar en ambas bacterinas ya que en el 2° y 3° sangrado mantuvieron las mismas lecturas de densidad óptica las cuales fueron de 0.06 (D.O.).

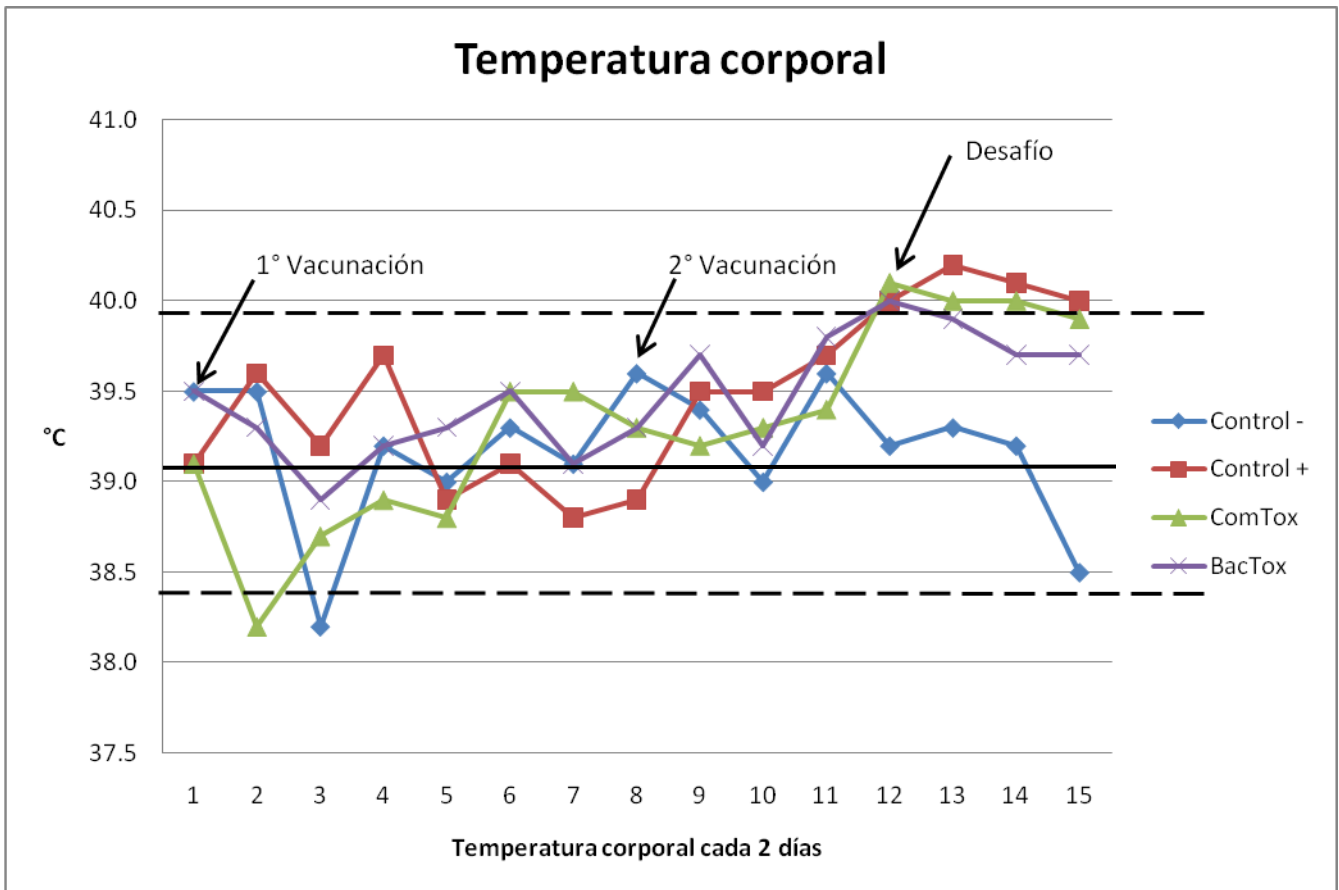
En la segunda vacunación, el grupo C: ToxCom presentó un aumento que se reflejó en el 4° y 5° sangrado con una D.O. 0.14 y 0.36 respectivamente.

Mientras que con el grupo D: BactTox presentó un aumento que se reflejó en el 4° y 5° sangrado con una D.O. 0.18 y 0.46 respectivamente.

PRUEBA DE POTENCIA

Temperatura y signos clínicos.

FIGURA 16. Temperatura corporal de todos los grupos.



El grupo A: Control (-) presentó hipotermia los primeros días. A partir del día 8 se mantuvieron temperaturas dentro del rango normal durante todo el experimento

El grupo B: Control (+) presentó temperaturas normales durante los primeros 23 días del experimento, después del desafío hubo presencia de hipertermia. Los animales de este grupo murieron entre las primeras horas hasta las 96 horas, cuando todos los cerdos de este grupo murieron, se decidió sacrificar a todos los cerdos de los demás grupos, incluyendo los animales del grupo control negativo.

El grupo C: ToxCom presentó hipotermia después de la primera vacunación. Durante 18 días se mantuvieron dentro de los rangos normales. Posterior al desafío se presentó hipertermia hasta el sacrificio de los animales.

El grupo D: BactTox desde la primera vacunación hasta el sacrificio mostró una temperatura dentro de los rangos normales pero no murieron.

Signos clínicos observados en los animales inoculados.

El grupo A: Control (-) no presentó ningún signo clínico respiratorio durante todo el experimento.

El grupo B: Control (+) no presentó ningún signo clínico respiratorio hasta el momento del desafío. Posteriormente mostraron severa anorexia, con dificultad al respirar, disnea de tipo abdominal, cianosis en piel del abdomen y orejas, temblorosos al caminar con dolor. Antes de la muerte los cerdos mostraron un chillido agudo característico con la presencia de epistaxis, hemorragia y espuma en los ollares y hocico.

El grupo C: ToxCom no presentó ningún signo clínico respiratorio hasta el momento del desafío. Posteriormente mostraron moderada anorexia, con dificultad

al respirar, disnea de tipo abdominal, en 2 cerdos se encontró cianosis en piel del abdomen y orejas.

El grupo D: BactTox no presentó ningún signo clínico respiratorio hasta el momento del desafío. Posteriormente mostraron ligera anorexia, disnea de tipo abdominal en 1 cerdo mientras que en otro se encontró cianosis en piel del abdomen y orejas.

FIGURA 17. Cerdo enfermo de pleuroneumonía, mostrando los signos clínicos de epistaxis o sangre en el hocico y ollares antes de la muerte.



Figura 18. Cerdo que murió dentro de las primeras 24 horas, en donde se observa la epistaxis en el hocico y en los ollares.



Figura 19. Cerdo que murió dentro de las primeras 24 horas, en donde se observa la epistaxis en el hocico y espuma sanguinolenta en los ollares.



Necropsia.

Inspección externa.

Se realizó la inspección externa: se inspeccionaron los orificios naturales buscando exudados, cambio de color y lesiones en las mucosas.

Incisión primaria.

El animal se colocó en decúbito dorsal y se procedió a desmembrar las extremidades anteriores con un corte a través de piel y músculos pectorales entre la escápula y el tórax. Esto permitió que los miembros cayeran lateralmente, manteniendo el cadáver en posición.

Dichos cortes se continuaron hacia adelante hasta la sínfisis mandibular por la cara interna de las ramas de la mandíbula. Se hicieron dos cortes en la cara medial de los miembros posteriores desarticulando en la región coxofemoral.

Se separó la piel y los músculos desde la mandíbula hasta la región púbica efectuándose también la incisión secundaria.

Faringe y laringe:

Por medio de cortes paralelos a lo largo de la parte interna de las ramas del maxilar inferior se llega a la cavidad bucal y se extrae la lengua jalándola en dirección al cuello. Se desarticulan los huesos hioides, la laringe y faringe, así como las tonsilas y los nódulos linfáticos submaxilares, retrofaríngeos, parotídeos, y la glándula parotídea.

Jalando la lengua hacia atrás, se cortan los músculos del cuello, a lo largo del trayecto de la tráquea. De este modo se liberan tráquea y esófago, unidos a la lengua y laringe, hasta la entrada de la cavidad torácica.

Cavidad torácica:

Para constatar el vacío de la cavidad torácica, puede hacerse, antes de abrirla, una pequeña incisión en el diafragma, un cuyo momento se percibe un soplo característico cuando el aire entra a la cavidad, en este momento, se colapsan los pulmones sanos. Se revisan cambios en pleura, pulmones, líquido pleural.

Al tirar de tráquea y esófago con la lengua, que ya se habían liberado anteriormente hacia atrás, se levantan los pulmones con el corazón y la parte torácica de la aorta, separando las adherencias pleurales a nivel de la columna vertebral. Se corta el esófago, aorta y cava.

Evaluación de las lesiones neumónicas.

Las lesiones encontradas para todos los serotipos se caracterizaron por ser pleuroneumónicas con hidrotórax con líquido sanguinolento, adherencias pleurales (viscerales y parietales), pericarditis y hemorragias en miocardio y linfonodos, infarto rojos y friables en lóbulos principalmente los caudales. Mencionar si hubo diferencias en alguno de los serotipos. Se determino el porcentaje de lesión neumónica.

GRUPO A. Pulmones SCPA en los cerdos Controles negativos, no vacunados ni desafiados

En el grupo A: todos los animales del grupo presentaron pulmones sin cambios patológicos aparentes (SCPA) tanto en su vista dorsal como en la ventral.

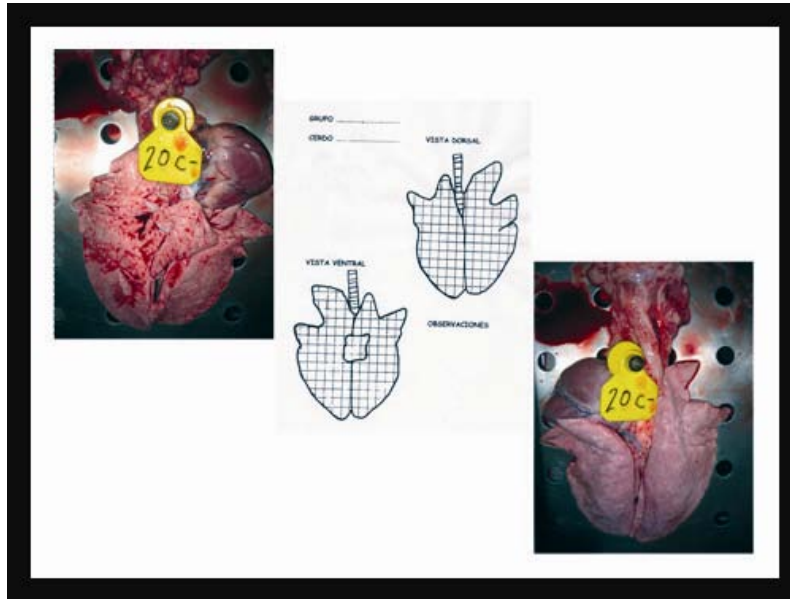


Figura 20. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos no infectados, en donde no se observan lesiones pulmonares y que no fueron anotadas en las planimetrías.

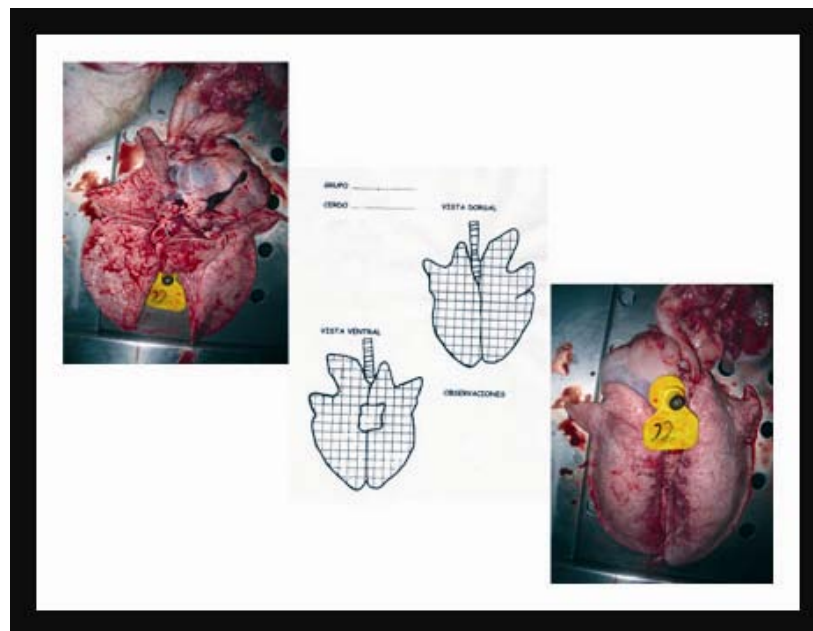


Figura 21. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos no infectados, en donde no se observan lesiones pulmonares y que no fueron anotadas en las planimetrías.

GRUPO B. Lesiones encontradas en los animales Controles positivos no vacunados y desafiados con los serotipos 1, 2, 3, 4 y 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

En el grupo B: los animales de este grupo presentaron lesiones neumónicas bilaterales principalmente en los lóbulos caudales. La tráquea y bronquios presentaron espuma sanguinolenta, exudado mucoso. Las aéreas neumónicas fueron oscuras, sólidas y friables al corte, acompañadas de adherencias pleurales (viscerales y parietales). En la cavidad torácica se encontró líquido sanguinolento con presencia de pericarditis y hemorragias en miocardio y linfonodos, infarto rojos.



Figura 22. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación.

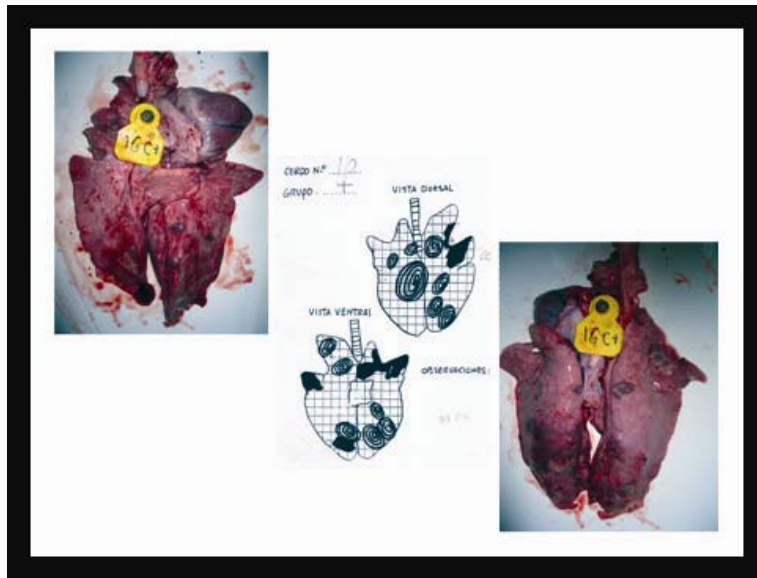


Figura 23. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación

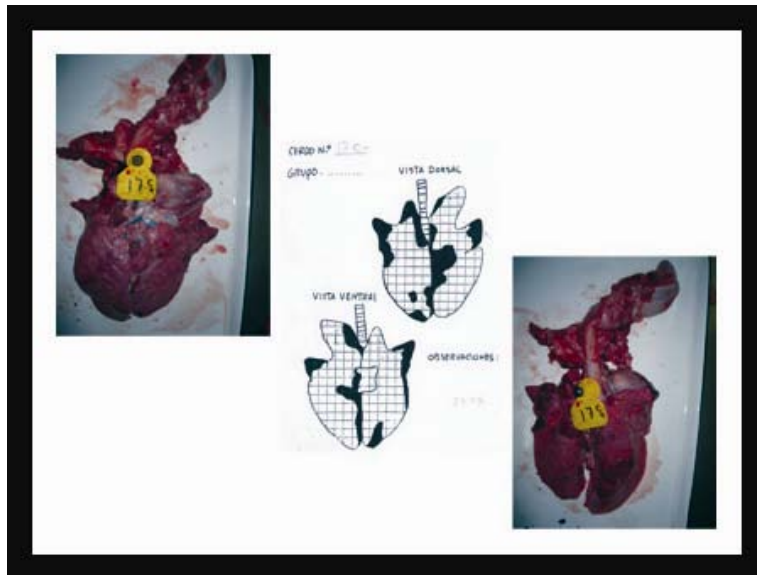


Figura 24. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación



Figura 25. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación

GRUPO C. Lesiones encontradas en los animales vacunados con la bacteria ToxCom y desafiados con los serotipos 1, 2, 3, 4 y 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

En el grupo C: los animales de este grupo presentaron lesiones neumónicas bilaterales principalmente en los lóbulos caudales. Las lesiones fueron de moderada extensión y de diferente tamaño presentes en los lóbulos caudales. En dichos lóbulos se encontraron nódulos parecidos a abscesos delimitados por una cápsula delgada de tejido conectivo, asociadas con adherencias pleurales. En algunos cerdos se encontraron aéreas neumónicas oscuras, sólidas y friables al corte, acompañadas de adherencias.

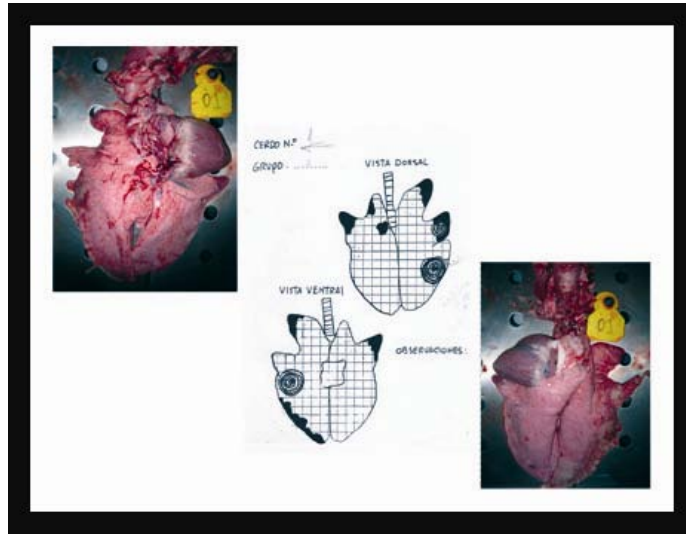


Figura 26. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos vacunados e infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación

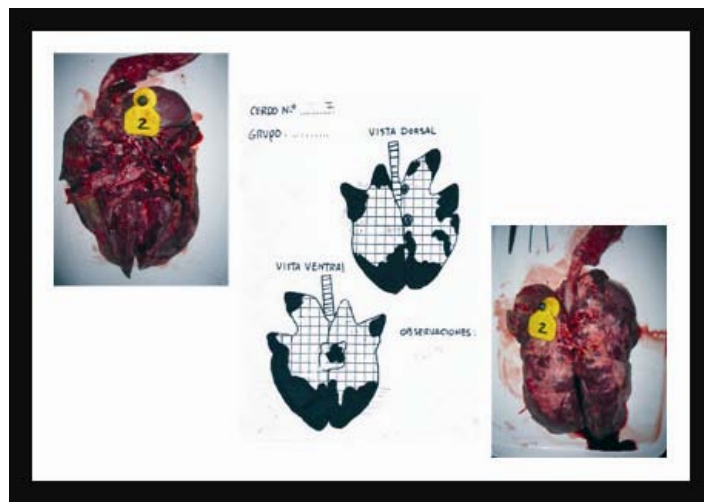


Figura 27. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos vacunados e infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación

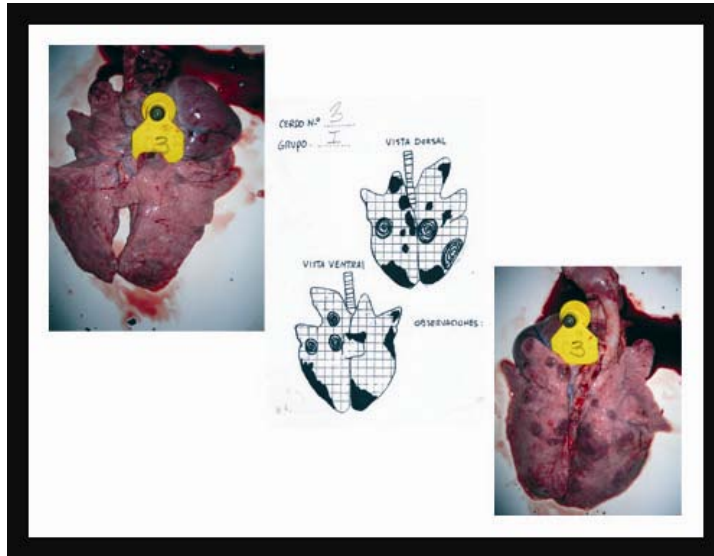


Figura 28. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos vacunados e infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación

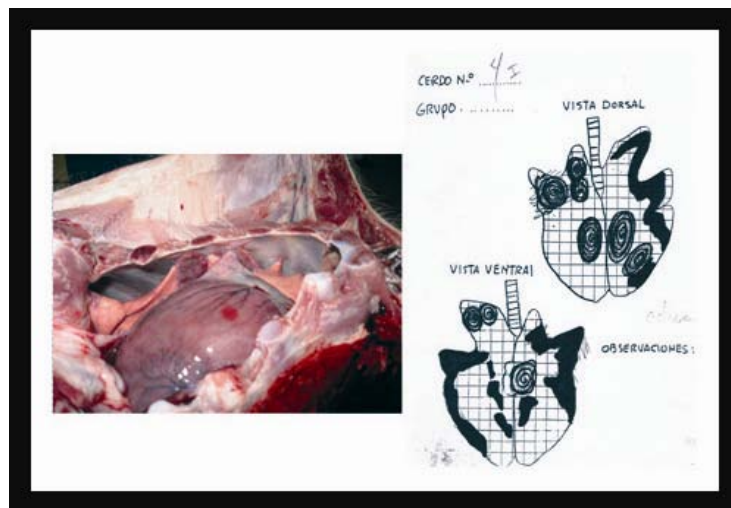


Figura 29. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos vacunados e infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación

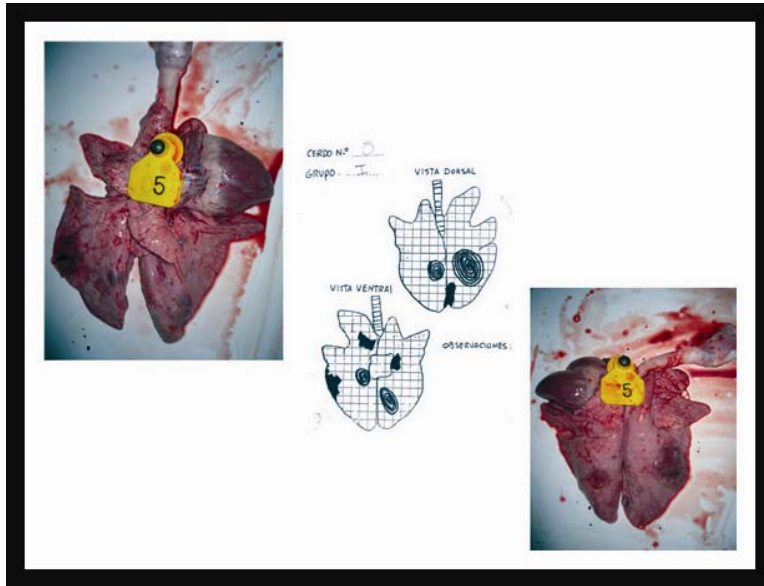


Figura 30. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos vacunados e infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación

GRUPO D. Lesiones encontradas en los animales vacunados con BactTox y desafiados con los serotipos 1, 2, 3, 4 y 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

En el grupo D: los animales de este grupo presentaron lesiones neumónicas bilaterales principalmente en los lóbulos caudales. Las lesiones fueron de menor extensión y de diferente tamaño presentes en los lóbulos caudales. Se encontraron nódulos parecidos a abscesos delimitados por una cápsula delgada de tejido conectivo, asociadas con adherencias pleurales. Se encontraron áreas neumónicas oscuras, sólidas y friables al corte, acompañadas de adherencias.

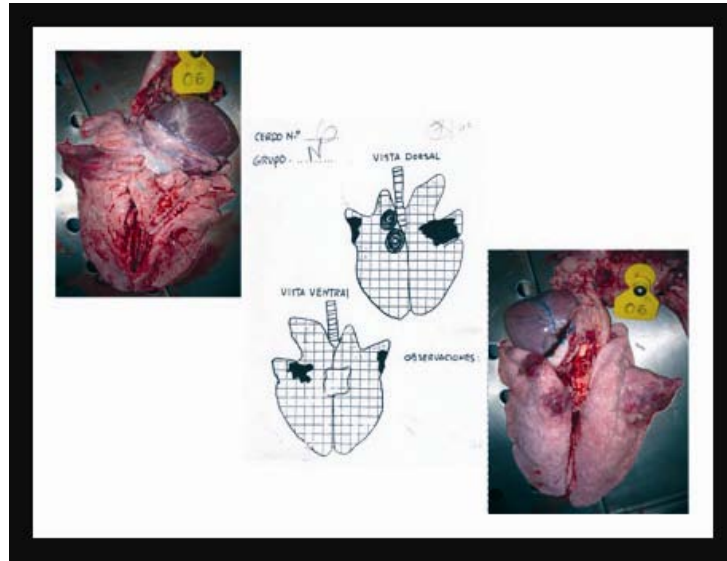


Figura 31. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos vacunados e infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación

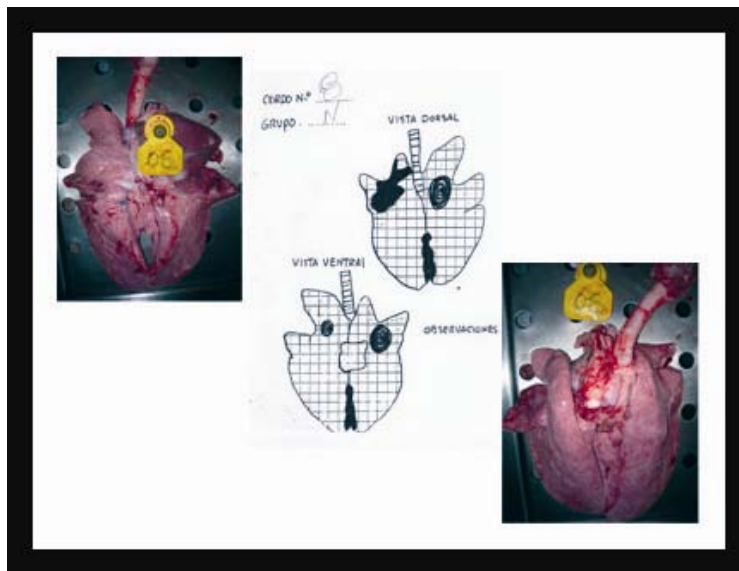


Figura 32. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos vacunados e infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación

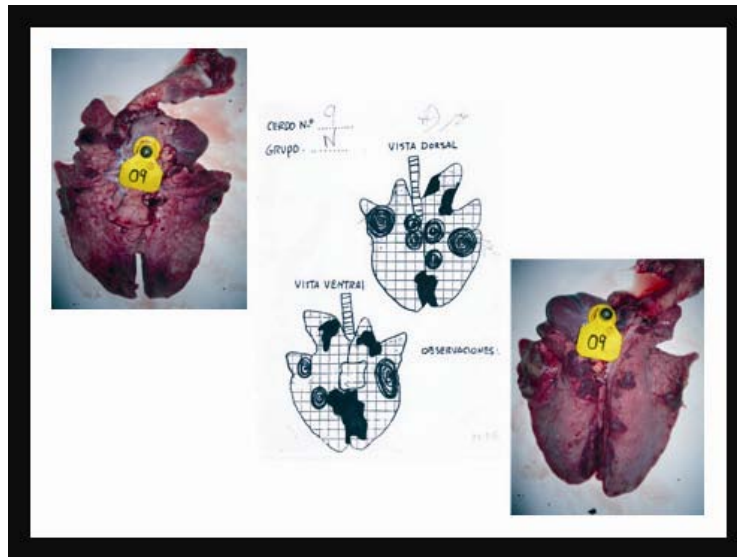


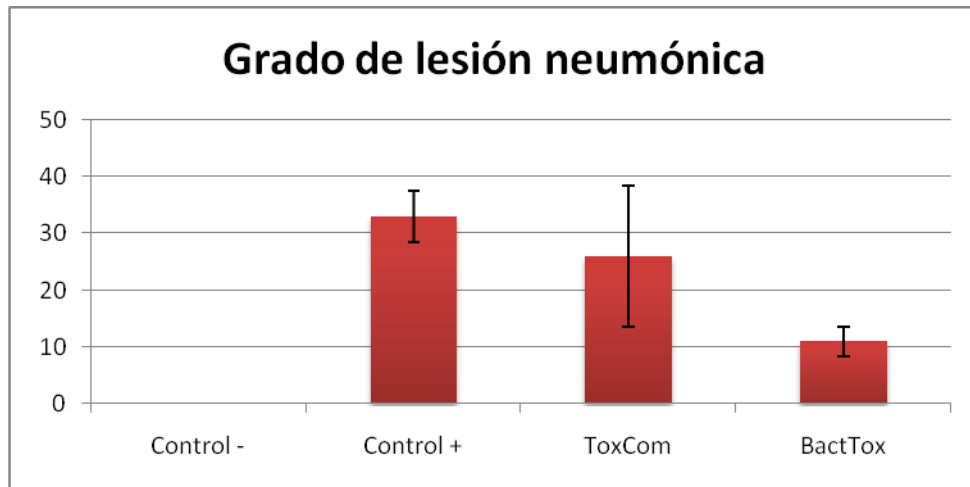
Figura 33. Vista dorsal y ventral de los pulmones colectados de cerdos vacunados e infectados, en donde se observan lesiones típicas pleuroneumónicas y que fueron anotadas en las planimetrías para su posterior evaluación

Planimetrías

El grado de lesión neumónica se determinó por planimetría en porcentaje.

El grupo A: no presentó ninguna lesión neumónica. Mientras que el grupo B: se presentó un promedio de 33 ± 4.6 . En el grupo C: se presentó un promedio de 26 ± 12.5 . En el grupo D: presentó un promedio de 11 ± 2.6 .

FIGURA 34. Porcentaje de las lesiones neumónicas encontradas en los grupos vacunados y no vacunados



El análisis de la Prueba *t* de Student fue 0.83155365.

Recuperación de los agentes inoculados.

Se recuperaron todos los serotipos en forma individual a partir de los pulmones de los cerdos que fueron inoculados con los diferentes serotipos.

Serotipificación de los aislamientos.

Todos los serotipos aislados correspondieron al serotipo inoculado en los cerdos.

DISCUSIÓN.

En la actualidad, muchas de las bacterinas comerciales incluyen el microorganismo completo, con el o los serotipos predominantes en la cada explotación o en una región predeterminada. Por lo general, dependiendo del laboratorio productor de biológicos, se elabora un calendario de vacunación, que considera lo siguiente: la administración de una dosis ha determinado tiempo al menos con una repetición a las 2-3 semanas (Christensen, 1982; Rosendal, et al., 1981).

Con respecto a las vacunas atenuadas, se han obtenido distintos mutantes tales como: mutantes sin cápsula, atenuados; mutantes auxotróficos, con los que se ha inducido -inmunidad protectora- pero sólo se han conseguido descensos en la mortalidad y lesiones. Donde sólo han sido estudiadas en condiciones experimentales y los animales vacunados resistieron el desafío intratraqueal, tanto del serotipo homólogo como heterólogos, y en el cual los autores mencionan que no hubo la presentación de signos clínicos y sin lesiones (Rosendal y MacInnes, 1990; Utrera, et al., 1990; Inzana, et al., 1993; Fuller y Mulks 1995).

Bacterinas realizadas a base de subunidades con antígenos de superficie han observado que inducen respuesta sérica, por lo que sólo han sido investigados desde el punto de vista antigénico-inmunogénico y no vacunal. Es el caso del LPS, se ha utilizado detoxificado y en adyuvante con resultados

protectores, aunque inferiores a los conseguidos con una bacterina a base cuerpo bacteriano. Algunas OMP del serotipo 5 en adyuvantes también fueron investigadas obteniendo un descenso significativo en el número de casos de neumonía, después de la infección intranasal con la cepa homóloga (Rapp y Ross, 1986; Rapp y Ross, 1988; Rioux, et al., 1998).

A su vez, se ha elaborado vacunas a base de extractos de cultivos; extractos crudos de cultivos jóvenes, en ocasiones precipitados con polietilenglicol o cetavión y conjugados con Apx, LPS y carbohidratos y, comúnmente, con adyuvantes, que han sido otra alternativa en la creación de bacterinas (Fedorka-Cray, et al. 1990; Hesse, et al. 1984; España, et al, 1986; Kume y Nakai, 1988).

Las toxinas Apx se consideran inmunógenos muy importantes, frente a los que se forman anticuerpos neutralizantes en el suero de cerdos convalecientes o inmunizados artificialmente. Del mismo modo, se ha utilizado un sobrenadante crudo de cultivo del serotipo 1, con Apx-I, solo o mezclado con una preparación inactivada de células enteras, en ambos casos con un adyuvante oleoso, siendo esta combinación la que comparativamente produjo los mejores resultados en forma del título de anticuerpos. En la actualidad, se comercializa una vacuna de subunidades con tres toxoides de Apx-I, Apx-II y Apx-III y una OMP con adyuvante oleoso. Se han descrito buenos resultados cuando se comparan con los controles,

pero el problema aún sigue sin resolverse de modo definitivo (Bendixen et al., 1981; Frey et al., 1989; Bossé et al., 1992; Martelli et al., 1996; Rodríguez et al., 2002).

Se ha estudiado una vacuna de oligosacáridos de la pared celular conjugados con un toxoide tetánico, comprobándose que los polisacáridos desempeñan un papel significativo en la inmunidad. Se ha desarrollado una vacuna conjugada que combinaba, en distintas opciones, la Apx-I con OMP y un adyuvante, con excelentes resultados en baja de mortalidad, pero no en el desarrollo de lesiones. Del mismo modo, la mezcla de polisacárido capsular con hemolisina o su conjugación con el LPS, produciéndose un aumento significativo del título de anticuerpos, con descenso de la mortalidad y lesiones, pero el producto no resolvió satisfactoriamente el control, todos los animales desarrollaron una fuerte respuesta humoral, comparable a la que se inducía en la infección natural, con una menor mortalidad y afectación en los controles, pero sólo frente a la exposición con el serotipo homólogo (Fenwick y Osburn, 1986; Byrd y Kadis, 1992; Prideaux, et al., 1999).

Por último, ha sido descrito una vacuna preparada a base de antígenos asociados a células recombinantes, así como antígenos secretados, entre ellos, proteínas de unión a transferrina y la toxina Apx-II. El preparado ha sido contrastado frente a la inoculación endobronquial con resultados de protección aceptables (Van Overbeke et al., 2000; Rodríguez et al., 2002).

En México, desde mediados de los años setentas, las infecciones respiratorias causadas por *A. pleuropneumoniae* (antes *H. pleuropneumoniae*) han sido reconocidas como un factor limitante en la producción porcina intensiva. Los primeros reportes que se tienen de la enfermedad son las descripciones clínicas del problema por Ramírez Necochea en 1976, mientras que los aislamientos y estudios exhaustivos del microorganismo fueron realizados por Pijoan y colaboradores en 1978 durante los brotes originales ocurridos en Tlaxcala, Penjamo y La Piedad. A partir de entonces no existe cuenca porcina del país en donde no se haya registrado la enfermedad, en aquellos años no había inmunógenos comerciales y el tratamiento-control se llevaba a cabo con antibióticos como la estreptomicina, ampicilinas y sulfonamidas que parecían ser eficaces (Ramírez y Pijoan 1982).

A partir de estos brotes comenzó la producción de biológicos con la finalidad de controlar la enfermedad. Consistieron en introducir la bacterina con los biotipos conocidos en ese momento (Ochoa y Pijoan. 1978).

Los primeros estudios sobre la efectividad de una bacterina de *A. pleuropneumoniae* (antes *H. pleuropneumoniae*) mostraron que en animales expuestos en forma natural, se protegieron al 100%, mientras que los animales desafiados con *A. pleuropneumoniae* vivos sólo se protegieron el 80% (Arizpe, Ochoa y Pijoan, 1978).

En la actualidad, existen en el mercado otro tipo de vacunas que combinan bacterinas y toxoides como la vacuna Ingelvac APPX o bien como la vacuna subunitaria producida por Intervet, que se han utilizado con mejores resultados, sin embargo, éstas siguen utilizando la vía de administración intramuscular o subcutánea lo cual implica la necesidad de personal especializado para su aplicación ocasionando daños al tejido del animal. El desarrollo de métodos de inmunización oral podría por tanto ser de suma importancia para el control. (Potter et al., 1996; Bagdasarian, et al., 1998; Huter et al., 2000).

En la FES-Cuautitlán, UNAM se ha trabajado y patentado un desarrollo tecnológico denominado “Proceso para elaborar un Toxoide-inmunógeno de *A. pleuropneumoniae* para la prevención de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina”. El desarrollo tecnológico consistió en cultivar, preparar, purificar y concentrar las toxinas (Apx I, Apx II y Apx III) de *A. pleuropneumoniae* a partir de los serotipos 1, 3, 5 y 7. Determinar hemolítica y citolítica de cada uno de los grupos (A, B, y C). E inactivar y preparar los toxoides (que se dará a conocer con el nombre de PLEUROTOXOIDE A, B, y C (Patente: No. PA/a/1998/009690).

Por los antecedentes anteriores, los diferentes antígenos juegan un papel trascendental en *A. pleuropneumoniae* y sus productos extracelulares, la idea de tener un sólo inmunógeno, que permitiría por su contenido proteger contra la mayoría de los serotipos presentes en México, que son: 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8, y

basándose en la presencia de las Apx que excretan estos serotipos se diseñó la presente bacterina que cubriera los requisitos de evitar la muerte y disminuir el grado de lesiones neumónicas.

Para ello, se tuvieron que reactivar a los serotipos que conformaron la fórmula de la bacterina denominada BactTox, encontrándose que el agente etiológico responsable de la pleuroneumonía contagiosa porcina almacenado en nitrógeno líquido, recuperado y cultivado en agar sangre-BHI donde se observó el Satelitismo y fenómeno de CAMP con la ayuda de la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* Cowan I. Para lograr la plena identificación se realizaron las pruebas bioquímicas de Catalasa, Oxidasa, Oxidación-Fermentación de glucosa y motilidad. Teniendo todos estos resultados se pudo confirmar que las cepas trabajadas fueron plenamente identificadas como *A. pleuropneumoniae* de referencia serotipo 1, 2, 3, 4 y 5. (Nicolet 1970; Kilian 1976; Moller et al., 1990).

Para la realización de la bacterina se requirieron las cepas de *A. pleuropneumoniae* de referencia serotipo 1, 2, 3, 4 y 5, prevalentes en México (Gottschalk et al. 2003; Gottschalk, 2006). Cultivadas de manera individual en medio líquido BHI suplementado con NAD. Estudios previos nos indicaron que cultivos de 12 horas contienen la concentración de bacterias adecuada lo que garantizó la presencia de las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII en el medio de cultivo. La interrupción de la incubación se realizó con formaldehído para inactivar al agente etiológico y

evitar la destrucción de las toxinas a causa de las proteasas propias del *A. pleuropneumoniae* (Negrete et al., 1994).

La biomasa y el sobrenadante inactivados se integraron con el adyuvante de hidróxido de aluminio de manera satisfactoria, ya que mostró una apariencia homogénea y sin grumos; con la fluidez deseada para una solución inyectable. Dando como resultado la bacterina requerida llamada BactTox. Las sales de aluminio (hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio), es el adyuvante más utilizado ya que logra la unión con el antígeno y al inocular en un animal producen un ligero granuloma que favorece la lenta eliminación del antígeno (estimulación antigénica más duradera) y la atracción de las células presentadoras por lo que aumentaba la capacidad de la respuesta inmune. El hidróxido de aluminio todavía es utilizado en la especie porcina, sobre todo para antígenos altamente inmunogénicos. (Sanchez-Vizcaino, 2004)

Con la bacterina BactTox lista, se procedió a la ejecución del diseño experimental para probar su inocuidad e inmunogenicidad. Al mismo tiempo, se realizó la comparación con una bacterina comercial ToxCom.

En la primera inmunización la bacterina ToxCom presentó una respuesta post-vacunal muy severa presumiblemente ocasionada por las características del adyuvante que es muy parecido a la vitamina E, siendo éste un adyuvante oleoso. En tanto, la bacterina BactTox en adyuvante de hidróxido de aluminio no presento

ninguna reacción post-vacunal. En la segunda inmunización, ni la bacterina ToxCom ni BactTox presentaron reacciones post-vacunales. Los grupos A y B no tuvieron reacción antígeno-anticuerpo por ser inmunoestimulados.

Recientemente se han descrito diversos métodos ELISA con especificidad de especie para *A. pleuropneumoniae*, dirigidos a las proteínas Apx. El procedimiento más conocido utiliza la proteína recombinante ApxII (Leiner et al., 1999), pero tiene el inconveniente de que esta toxina no está presente en las cepas de los serotipos 3 y 10. Una alternativa posible es la detección simultánea y múltiple de las tres toxinas Apx (Nielsen et al., 2000). En este caso, el ELISA sí que permite detectar a cepas de los 12 serotipos, pero no discriminar entre ellos. En este estudio, el seguimiento serológico durante todo el experimento para identificar los anticuerpos contra las toxinas ApxI, ApxII y Apx III, fue determinada con la prueba de ELISA indirecto (López et al., 2008) durante las primeras semanas fue similar en los grupos C y D; teniendo ambos un ligero aumento en la respuesta inmune.

El comportamiento serológico de ToxCom en los siguientes muestreos fue típico de una respuesta secundaria de menor magnitud. El comportamiento serológico de BactTox en los siguientes muestreos fue típico de una respuesta secundaria de mayor magnitud (Figura 15).

Los resultados encontrados por otros autores encuentran que la mezcla de polisacárido capsular con hemolisina o su conjugación con el LPS, producen un aumento significativo del título de anticuerpos, además de que encontraron un descenso de la mortalidad y lesiones. Todos los animales desarrollaron una fuerte respuesta humoral, comparable a la que se inducía en la infección natural, con una menor mortalidad y afectación que los controles, pero sólo frente a la exposición con el serotipo homólogo, como fue en nuestro caso (Fenwick y Osburn, 1986; Byrd y Kadis, 1992; Prideaux, et al., 1999).

El desafío que se realizó fue mediante el uso de una cámara de aerosoles (Lara et al., 2008), mientras que en otros experimentos, los animales vacunados que resistieron el desafío intratraqueal, tanto del serotipo homólogo como heterólogos, y aunque los autores mencionan que no hubo la presentación de signos clínicos y sin lesiones (Rosendal y MacInnes, 1990; Utrera, et al., 1990; Inzana, et al., 1993; Fuller y Mulks 1995). En este estudio, se hizo un desafío homólogo con todos los serotipos que estaban presentes en la bacterina BactTox si se encontraron lesiones pero fueron en menor grado en el Grupo D vacunado con BactTox.

La temperatura observada en los diferentes grupos reveló que en relación al Grupo A, la hipotermia se debió a las condiciones de manejo e instalaciones. Mientras que en el Grupo B, no se observó ningún efecto en los primeros 23 días. La presencia de hipertermia se debió a la infección con *A. pleuropneumoniae*.

En el Grupo ToxCom los animales presentaron hipotermia debido a las condiciones de manejo e instalaciones y no por la reacción post-vacunal. Mientras que la presencia de hipertermia se debió a la infección con *A. pleuropneumoniae*.

Los cerdos que fueron inmunizados con BactTox, no se observó ningún efecto, solo mostro una ligera hipertermia horas después de la infección.

Los signos clínicos observados en los cerdos de los diferentes Grupos fue variable y en el caso de los animales del Grupo A, durante todo el experimento se mantuvieron un condiciones normales.

En los cerdos del Grupo B control positivo, los animales inoculados con App presentaron mayor dificultad respiratoria con tendencia al agravamiento por no tener la inmunización requerida mostró una alta susceptibilidad a la infección, siendo la infección la causa de la muerte.

En los cerdos del Grupo C, inmunizados con ToxCom, los animales inoculados con App presentaron menores signos clínicos generales y respiratorios con tendencia a la recuperación debido a la inmunización. Mientras que los vacunados con BactTox, los animales inoculados con *A. pleuropneumoniae* presentaron ligera signología general y respiratoria con mayor tendencia a la recuperación debido a la inmunización.

Los animales del Grupo A, no presentaron ninguna lesión neumónica. Los pulmones de los cerdos no estaban afectados y no presentaban lesiones. No se encontró ningún grado de lesión neumónica.

En los cerdos del Grupo B, los animales de este grupo presentaron lesiones fueron características de una pleuroneumonía aguda (Shope et al., 1964) y las aéreas de consolidación que abarcaron de 28.1 al 38.8%. El grado de lesión neumónica encontrada en este grupo represento el 100% de las lesiones provocadas por la infección experimental a la dosis señalada (Sebunya y Saunders 1983; Fenwick, B. and Henry, S. (1994).

El Grupo ToxCom: Los cerdos de este grupo presentaron lesiones pleuroneumónicas crónicas y las aéreas de consolidación que abarcaron de 15.4 al 42.3%. El grado de lesión neumónica encontrada en este grupo represento el 78.8% de las lesiones provocadas por la infección experimental a la dosis señalada. Lo cual se traduce en una reducción de solo el 21.2% (Sebunya y Saunders 1983; Fenwick y Henry 1994).

El Grupo BactTox: Los cerdos de este grupo presentaron lesiones pleuroneumónicas crónicas y las aéreas de consolidación que abarcaron de 7.6 al 13.1%. El grado de lesión neumónica encontrada en este grupo represento el 33.3% de las lesiones provocadas por la infección experimental a la dosis señalada. Lo cual se traduce en una reducción del 66.7%.

La recuperación de *A. pleuropneumoniae* solo se logro en los Grupos inoculados con el agente y los agentes infecciosos recuperados correspondieron a los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 de *A. pleuropneumoniae* inoculados. En el Grupo A no se aisló ningún agente infeccioso.

En los últimos años, se ha venido insistiendo reiteradamente en la vacunación, en la creencia de que una buena vacuna será decisiva en el control. Desde los productos biológicos más antiguos hasta los productos más recientes, se han experimentado diversidad de combinaciones, en las que algunos factores de virulencia, especialmente las Apx, han centrado el interés. Pese a todo, aún se carece de un producto que proteja frente a la enfermedad aguda y prevenga la condición de portador crónico y eliminador de *A. pleuropneumoniae*. Las bacterinas reducen la gravedad y la mortalidad, pero no resuelven el problema de la prevención ni la persistencia de lesiones o la presencia de portadores (Rodríguez et al., 2002).

CONCLUSIONES

La bacterina no produjo ningún efecto en los cerdos sanos cuando fueron vacunados.

La bacterina BactTox produjo dos picos de hipertermia en los cerdos cuando fueron inmunizados.

Posterior al desafío los cerdos vacunados presentaron fiebre pero no murieron dentro de las 96 horas.

Los signos clínicos respiratorios en los cerdos no vacunados fueron graves.

Los cerdos vacunados no murieron y fueron sacrificados después de las 96 horas.

A la necropsia, las lesiones encontradas en los lóbulos pulmonares y las planimetrías realizadas revelaron los siguientes porcentajes: BactTox 11.0 +/- 2.62; ToxCom 26 +/- 12.5; Control positivo 33 +/- 4.6 y control negativo 0.

La bacterina BactTox redujo las lesiones neumónicas hasta en un 66%.

La bacterina ToxCom redujo las lesiones neumónicas solo el 21%.

REFERENCIAS

- Aline A.S. (1980). Manual de Necropsias en Animales Domésticos. Editorial CECSA.
- Arizpe, H., Ochoa, G. y Pijoan C. (1978). Estudio sobre la efectividad de una bacterina experimental en la prevención de neumonías causadas por *Haemophilus parahaemolyticus*. Memorias de la Primera Reunión Anual de Investigación en Medicina Veterinaria México, p. 49.
- Bagdasarian, M., Nagai, M., Frey, J., Bagdasarian, M. (1998). Immunogenicity of *Actinobacillus* ApxIA toxin epitopes fused to the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit. *Vaccine* 17:441-447.
- Bauer, M. and Welch, R. (1996). Association of RTX toxins with erythrocytes. *Infection and Immunity*. 64:4665-4672.
- Bendixen, P.H., Shewen, P.E., Rosendal, S. and Wilkie B.N. (1981). Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes, and testicular cells. *Infect Immun*. 1981 September; 33(3): 673-676.
- Bertram, T.A. (1988). Pathobiology of acute pulmonary lesions in swine infected with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.* 29:574-577.

- Bertschinger, H.U., Seifert, P. (1978). Isolation of a *Pasteurella haemolytica*-like organism from porcine necrotic pleuropneumoniae. Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc. 5:Abstr M19.
- Blackall, J., Klaasen, H.L., van de Bosch, H., Kuhnert, P., Frey, J. (2002). Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Serovar 15. Vet. Microbiol. 84:47-52.
- Bossé, J., MacInnes, I. (2003). Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. Can. J. Vet. Res 64:145-150.
- Bossé, J.T., Janson, H., Sheehan, B., Beddek, A., Rycroft, N., Kroll, S., Langford, P. (2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. Microbes and Infection 4:225 -235.
- Bossé, J.T., Johnson, R.P., Nemeč, M. and Rosendal, S. (1992). Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Infect. Immun. 60:479-484.
- Bosse, Janine T; (et.al.). 1990. Capsular Polysaccharide Antigens for Detection of Serotype-specific Antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can J Vet Res; 54: 320-325.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Bioches 72: 248-254.

- Christensen, G. (1982). Pleuropneumonia in swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae* s. *parahaemolyticus*. III. Observations on the clinical manifestations in the livestock and its therapeutic and immunoprophylactic possibilities. *Nord Vet Med.* 1982 Apr-May;34(4-5):113-23.
- Ciprián A, Medina G, Fuentes M, et al. (1988). Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. *Vet Mex*;19:205-210.
- Ciprián, A., Colmenares, G. Y Mendoza, S. (1990). La Enfermedad en México *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. Compendio sobre *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. Editado por AMVEC, AC. Guadalajara, Jal, México. Pp. 29-42.
- Ciprián, C.A. (1999). Impacto del diagnóstico serológico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en las diferentes practicas de destete. *Memorias Enfermedades Infecciosos en el Cerdo de la Asociación de Médicos Vetrerarios Especialistas en cerdos de los Altos de Jalisco.* Pags. 28-45.
- Ciprián, C.A.; Mendoza, E.S., Cruz, S.T., Colmenares, V.G., Romero, R.A. (1999). Sistema rápido para el diagnostico serologico de App- Hps -Pm -Mh denominado NEUMOTESTMR . (Marca Registrada UNAM). *Memorias del VIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (ALVEC) y VII Congreso Organismo Iberoamericano de Porcicultura (OIP), Colima, México.*

- Colmenares, V., Mendoza, S., Ayala, G., and Ciprián, A. (1992). A rapid field serological test for the diagnostic of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Proceedings 12 th. International Pig Veterinary Society, 1992. The Hague, The Netherlands. P, 223. (1992).
- Cruz, J.G. y Martinez, R.H.A. (1980). Estudio sobre la respuesta inmune en cerdos inoculados con *Haemophilus parahaemolyticus*. Tesis de Licenciatura, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Cuautitlán, UNAM.
- Dubreuil, J. D., Jacques, M., Mittal, K.R., Gottschalk, M. (2000). *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal Health Research Reviews* 1(2):73–93
- España, E.: Costa, Ll.; Riera, P. y Casadevall, P.(1986). Estudio de la efectividad de tres vacunas contra la pleuroneumonía porcina mediante infección experimental. *Med. Vet.* 3: 385.
- Fedorka-Cray, P.J., Huether, M.J., Stine D.L. and Anderson G. A. (1990). Efficacy of a cell extract from *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* serotype 1 against disease in swine. *Infect Immun.* 1990 February; 58(2): 358-365
- Fenwick, B. and Henry, S. (1994). Porcine pleuropneumonia. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 204:1334-1340.

- Fenwick, BW; Osburn, Bl. (1986). Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infect Immun.* 1986 Nov;54(2):575–582.
- Frey, J. (1989). Cloning and Expression of a Cohemolysin, the CAMP Factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection Immunity.* 57(7): 2050-2056.
- Frey, J. (1995). Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends in Microbiol.* 3:257-261.
- Frey, J. (2003). Detection, identification, and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Methods Mol. Biol.* 216:87-95.
- Frey, J., Bosse, J.T., Chang, Y.F., Cullen, J.M., Fenwick, B., Gerlach, G.F., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T.J., Jansen, R., Kamp, E.M., MacDonald, J., Macinnes, J.I., Mittal, K.R., Nicolet, J., Rycroft, A.N., Segers, R.P.A.M., Smits, M.A., Stenbaek, E., Struck, D.K., van den Bosch, J.F., Wilso, P.J., Young, R. (1993). *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX toxins: Uniform designation of haemolysins, cytolysins pleurotoxin and their genes. *J. Ge. Microbiol.* 139:1723-1728. *Infection Immunity.* 57(7): 2050-2056.
- Frey, J., Perrin, J. and Nicolet, J. (1989). Cloning and expression of a cohemolysin, the CAMP factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun.* 1989 July; 57(7): 2050-2056.

- Fuller, TE, and Mulks, MH (1995). Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* riboflavin biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 177: 7265-7270.
- Gottschalk M and Taylor D.J. (2006). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: *Diseases of Swine*. Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S. Taylor, D.J. 9th Edition. Blackwell Publishing. p 563-576.
- Gottschalk, M. (1998). Avances recientes en el diagnóstico, tipificación y control de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis*. *Memorias del VII Día del Porcicultor 1998*. Asociación de Médicos Veterinarios Zootecnistas Especialistas en Ciencias Porcícolas del Sur de Sonora, A.C., Navojoa, Sonora, México, 1998. Pp 86-98.
- Gottschalk, M., Broes, A., Fittipaldi, N. (2003). Recent developments on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Pro. Am. Assoc. Swine Vet.* 387-393.
- Haesebruck, F., Chiers, K., Van Overbeke, I. and Ducatelle, R. (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* 58:239-249.
- Hesse, R.; Stoll, M.; Coon, J.; Simonson, R. (1984). Development *Haemophilus pleuropneumonia* vaccination / challenge studies. *International Pig Veterinary Society. Proceedings 8th IPVS Congress Ghent, Belgium. August 27-31 1984.* p. 111.

- Huter, V., Hensel, A., Brand, E., Lubitz, W. (2000). Improved protection against lung colonization by *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghosts: characterization of a genetically inactivated vaccine. *Journal of Biotechnology*. 83:161-172.
- Inzana, T.J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski, R.P., Anderson, P. (1988). Virulence Properties and Protective Efficacy of the Capsular Polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* Serotype 5. *Infection And Immunity*. 56(8):1880-1889.
- Inzana, T.J., Todd, J., Veit, H.P. (1993). Safety, stability and efficacy of non-encapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect. Immun.* 61: 1682-1686.
- Jacobsen, M.J. (2005). Deletion of the Ferric Uptake Regulator Fur Impairs the In Vitro Growth and Virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*. 73(6): 3740–3744.
- Jansen, R., Briare, J., Kamp, E.M. Gielkens, A.L.J., Smits, M.A. (1995). Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun.* 51:419-424.
- Kilian, M. (1978). The haemolytic activity of *Haemophilus* species. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B)* 84 :339-341.
- Kilian, M., Nicolet, J., Biberstein, E.L. (1978). Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Mathews and Pattison,

1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28 :20-26.

- Kume, K. and T.Nakai, Y. (1988). Efficacy of a Bivalent Vaccine Containing Jpn.J.Vet.Sci. 50: 237, 1988.Serovar 2 and 5 Strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* in Pigs or Guinea Pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.* 50(1):237-241.
- Lara, H., Mendoza, S., Quezada, F., Cortés, R., Lozano, B., Sarfati, D., Soto, E., Ciprián, A. (2008). Experimental infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF pigs using an aerosol chamber. Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress. Durban, South Africa, 22-26 June. 2008. Pp103.
- Leiner, G., Franz, B., Strutzberg, K., y Gerlach, G.F. (1999). A novel enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxII antigen for diagnosis of pleuropneumonia in pig herds. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6:630-632.
- Lenser D.K. et al., (1988). Protein of Mice Against the Lethal Effect of an Intraperitoneal Infection with *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* after Vaccination with Capsular Proteins. *Vet. Microbiol.* 18: 335-348.
- Ling, Mei; (et. al). 2006. Study on the Immunogenicity of N – terminal polypeptide of RTX Toxin I of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Chinese Journal Biotechnology.* 22 (1): 39 – 45.

- Lopez, J., Quintanar-Guerrero, D., Hernández-Baumgarten, E., Trujillo, D., Quezada, F., Lara, H., Romero, A., Suarez, F., Torremorell, M., Chavez, E., Ciprián, A., Mendoza, E. (2008). Experimental development an immunogen using the purificate toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* under the carrier and protection system in pigs. Proceedings of the 20th International Pig Veterinary Society Congress. Durban, South Africa, 22-26 June. 2008. Pp234.
- MacInnes, J.I. , Bossé, J.T. (2004). *Actinobacillus*. En : Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Ed. Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. Third Edition. Blackwell Publishing. Pp. 225-241.
- Maier, E., Reinhard, N., Benz, R., Frey, J.(1996). Channel-forming activity and chanell size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity* 64:4415-4423.
- Martelli P, Guadagnini PF, Foccoli E, Ballarini G. (1996). Efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine in the control of pleuropneumonia: A field trial. *IPVS Proc. Bologna, Italy.* 1996;214.
- Matthews, P.J.R., Pattison, I.H. (1961). The identification of a Haemophilus-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. *J. Comp. Pathol* 71:44-52.
- Mendoza, S., Ayala, G., Torres, O., and Ciprián, A. (1992). Study of a farm affected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* using the serological test

PLEUROTETMR . Proceedings 12 th. International Pig Veterinary Society, 1992. The Hague, The Netherlands. P, 188.

- Moller, K. (et. al.). 1990. V Factor-Dependent Members of the Family Pasteurellaceae in the Porcine Upper Respiratory Tract. *Journal Clinical Microbiology*. 28 (12): 2711-2716.
- Narita, M., Kawashima, K., Morozumi, T., Takashima, H. (1995). Effect of physical defenses of the respiratory tract on the development of pneumonia in pigs inoculated endobronchially with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J.Vet. Med. Sci.* 57:839-844.
- Negrete-Abascal, E., Reyes, M.E., Garcia, R., Vaca, S., Girón, J., Garcia. O., Zenteno, E., de la Garza, M. (2003). Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 185(2):664–668.
- Negrete-Abascal, Tenorio, V.R., Serrano, J.J., García, C.C., de la Garza, M. (1994). Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatine, hemoglobin and IgA. *Ca. J. Vet. Res* 58:83-86.
- Nicolet, J. (1968). Sur l'hémophilose du porc. I. Identification d'un agent fréquent : *Haemophilus parahaemolyticus*. *Pathol Microbiol* 31: 215-225.
- Nicolet, J. (1970). Aspects microbiologiques de la pleuropneumonie contagieuse du porc. These d'habilitation, Berne.
- Nielsen, R. (1984). *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes – cross protection experiments. *Nord Vet Med* 36:221-234.

- Nielsen, R. (1985). *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) serotypes 8, 3 and 6 – serological response and cross immunity in pigs. *Nord Vet Med* 37:217-227.
- Nielsen, R., van den Bosch, J.F., Plambeek, T., Sorensen, V. and Nielsen, J.P. (2000). Evaluation of an indirect enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 71:81-87.
- Ochoa, G. y Pijoan C. (1978). Descripción de 2 biotipos de *Haemophilus parahaemolyticus* encontrados en cerdos con neumonía. *Memorias de la Primera Reunión Anual de Investigación en Medicina Veterinaria México*, p. 48.
- Olander, H.J. (1963). A septicaemic disease of swine and its causative agent *Haemophilus parahaemolyticus*. Ph.D. Diss Univ. California.
- Patente UNAM en trámite (2008). Proceso para elaborar un toxoide-inmunógeno de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a base de ultrafiltración fraccionada para la prevención de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina. IMPI No. PA/a/1998/009690.
- Pattison, I.H., Howell, D.G., Elliot, J. (1957). A *Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *J. Comp. Pathol* 67:320-329.

- Perry, M. B., E. Altman, J.-R. Brisson, L. M. Beynon, and J. C. Richards. 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Serodiag. Immun. in Infect. Dis.* 4:299-308.
- Pijoan, C., Ochoa, G., Mendez, D., y Lastra, A. (1978). Aislamiento de *Haemophilys parahaemolyticus* de cerdos con neumonía. *Tec. Pec Mex.* 34:85-87.
- Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiksen, W., Manheim, W. (1983). Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. Nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic relatedness. *Inst. J. Syst. Bacteriol.* 33:510-514.
- Potter, A., Gerlach, G., Willson, Ph., Rossi-Campos, A. (1996). Vaccines for *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 20:63-74.
- Prideaux, C. T., Lenghaus, C., Krywult, J., Hodgson, A. L. M. (1999). Vaccination and Protection of Pigs against Pleuropneumonia with a Vaccine Strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Produced by Site-Specific Mutagenesis of the *ApxII* Operon. *Infect. Immun.* 67: 1962-1966.

- Ramírez Necoechea R. y Pijoan Aguadé C. (1982). Haemophilus. En Diagnostico de las Enfermedades del Cerdo. Primera Edición Mexicana, Ramírez Necoechea R. y Pijoan Aguadé C. pp. 515-519.
- Rapp, V. J. and R. F. Ross. (1986). Antibody response of swine to outer membrane components of Haemophilus pleuropneumoniae during infection. Infect. Immun. 54: 751.
- Rapp, Vicki J; Ross, Richard F. (1988). Immunogenicity of Outer Membrane Components of Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae. Can Vet J. Jul;29(7):585–587.
- Reimer, D., Frey, J., Jansen, R., Veit, H.P., Inzana, T.J. (1995). Molecular investigation of the role ApXI and ApXII in the virulence of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 5. Microb. Pathog. 18:197:209.
- Rioux, S., Galarneau, C., Harel, J., Frey, J., Nicolet, J., Kobisch, M., Dubreuil, D., Jacques, M. (1999). Isolation y characterization of mini Tn10 lipopolysaccharide mutants of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1. Can. J. Microbiol. 45:1017-1026.
- Rioux, S., Girard, C., Dubreuil, D., Jacques, M. (1998). Evaluation of the protective of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1 detoxified lipopolysaccharides or O-polysaccharide protein conjugate in pigs. Res. Vet. Sci. 65:165-167.

- Rodríguez, E.F., Gutiérrez, C., de la Puente, V., García, N., Monter, J.L., del Rio M.L., García, N., Blanco, M., Navas, J. Boronat, N.L. (2002). Pleuroneumonía porcina. Información Veterinaria. Nº 234, marzo 2002, pág. 35-44.
- Rosendal, S; Carpenter, DS; Mitchell, WR; Wilson, MR. (1981). Vaccination against pleuropneumonia of pigs caused by Haemophilus pleuropneumoniae. Can Vet J. 22(2):34–35.
- Rosendal,S. and MacInnes, T.I. (1990). Characterization of an attenuated strain of Actinobacillus pleuropneumoniae, serotype 1. Am.J.Vet.Res. 51: 711, 1990.
- Rossi-Campos, A; Anderson, C; Gerlach, GF; Klashinsky, S; Potter, AA; Willson, PJ. (1992). Immunization of pigs against Actinobacillus pleuropneumoniae with two recombinant protein preparations. Vaccine 10(8):512–518.
- Sanchez-Vizcaino, J.M. (2004). Curso de Introducción a la Inmunología Porcina: Capítulo 8: Vacunas Atenuadas e Inactivadas. “2a. Edición. <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca082.htm>
- Schaller, A., Kuhnert, P., de la Puente-Redondo, V.A., Nicolet, J., Frey, J. (2000). Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. Vet. Microbiol. 74:365-376.

- Sebunya TNK, Saunders JR. (1983). Haemophilus pleuropneumoniae infection in swine: a review. JAVMA;182:1331-1336.
- Shope R.E. 1964. Porcine Contagious Pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. J Exp Med;119: 357-368
- Shope R.E., White, D.C., Leidy, G. (1964). Porcine Contagious Pleuropneumonia. II. Studies of the pathogenicity of the etiological agent Haemophilus pleuropneumoniae. J. Exp. Med. 119:369-375.
- Sibille, Y., Reynolds, H.Y. (1990). Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. Am. Rev. Respir. Dis. 141:471-501.
- Sotres F.; Ciprián A.; Mendoza S.; Antillón A.; Lozano B.; Sarfati D.; Soto E.; Quezada F.; Lara H.; 2007. Diseño y Elaboración de una cámara de nebulización para cerdos. Memorias del XLII Congreso Nacional Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos A.C. Querétaro, Querétaro. p.p. 251.
- Torres, O., Mendoza, S., Ayala, G., and Ciprián, A. (1992). Serological diagnostic with PLEUROTTEST MR and microbiological study of Actinobacillus pleuropneumoniae in samples collected at slaughterhouse. Proceedings 12 th. International Pig Veterinary Society, 1992. The Hague, The Netherlands. P, 224.

- Udeze, F.A., Latimer, K.S., Kadis, S. (1987). Role of Haemophilus pleuropneumoniae lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine Haemophilus pleuropneumonia. Am. J. Vet. Res. 48:768-773.
- Utrera, V. et al. (1990). International Pig Veterinary Society. Proceedings 11th IPVS Congress.Lausanne:pp 12.
- Van den Bosch H. and Frey, J. (2003). Interference of outer membrane protein Pa1A with protective immunity against Actinobacillus pleuropneumoniae infections in vaccinated pigs. Vaccine 21:3601-3607.
- Van Overbeke, I. Ducatelle, C.K. and Hausebrouck, R. (2001). Effect of endobronchial challenge with Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. J. Vet. Med B Infect. Dis. Vet. Public Health 48:15-20

White, D.C., Leidy, G., Jamieson, J.D., Shope, R.E. (1964). Porcine Contagious Pleuropneumonia. III. Interrelationship of Haemophilus pleuropneumoniae to other species of Haemophilus : Nutritional, metabolic, transformation and electron microscopy studies. J. Exp. Med. 120:1-12.