



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“ESTUDIO TRANSVERSAL PARA IDENTIFICAR LA CIRCULACIÓN
DEL BIOTIPO II DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN ALGUNOS
ESTADOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA”.**

T E S I S
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
MAESTRA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PRESENTA:
ANA GABRIELA LÓPEZ MEZA

TUTOR PRINCIPAL:
MARÍA DEL CARMEN MERCADO GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
COMITÉ TUTOR:
JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN-UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX.

JUNIO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Con amor y respeto a mis padres: Ana María Meza Gómez y José Luis López Lagunas. Gracias por ser mis guías, por quererme tanto y por su apoyo constante. LOS AMO Y HONRO SU EXISTENCIA.

A mi hermana adorada, Ivonne López Meza. Sabes que te amo con todo el corazón...tu perseverancia y la superación constante es algo que admiro profundamente de ti, eres un gran ejemplo a seguir, te amo.

Al hombre con el que deseo caminar todos los días tomada de la mano, Edgar Ulises Moreno Muñoz. Gracias porque juntos hacemos que la vida sea una aventura constante; eres un profesional ejemplar, admiro tu constancia, perseverancia y rectitud, te amo.

Agradecimientos

A la Dra. Carmen Mercado García, gracias por su orientación constante, por la dedicación que le prestó a este proyecto y por alentarme en momentos de desesperación.

Al Dr. Iván Sánchez Betancourt por atender mis dudas y por la disposición del material necesario. A la Dra. Susana Mendoza por las observaciones a este trabajo.

Al Dr. Evaristo Barragán por la asesoría constante, sus clases fueron una gran oportunidad para acercarme con gusto a la estadística.

A la Dra. Esperanza Galván Pérez por las grandes hazañas realizadas para ir al rastro, ¿Se acuerda?, también a la Dra. Alejandra Mercadillo por colaborar en la parte de aislamiento bacteriano.

A la Bióloga Amanda Gayosso por dejarme ingresar al laboratorio de genética y por enseñarme a hacer la extracción de ADN.

A la Dra. Mireya de la Garza y al Dr. Delfino Godínez por facilitarme las cepas de referencia.

A la Sra. Carmen, Alberto y Rosa María por la disposición del material en la parte de bacteriología.

A la Dra. Rebeca Martínez por la asesoría en la parte de diseño de primers y cuantificación de ADN.

A mis compañeros del departamento con los que comparto “La lechonera” y el laboratorio, que indudablemente algún día serán “El pie de cría de la producción porcina nacional”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Contenido	Página
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
CONTENIDO	III
SINOPSIS.....	V
INTRODUCCIÓN	1
Agente etiológico	2
Serotipos	3
Genoma.....	4
Factores de virulencia	4
Polisacáridos capsulares (CPS)	4
Lipopolisacáridos (LPS)	5
Proteínas de membrana externa (PME)	6
Sistemas de captación de hierro	7
Proteasas	9
Fimbria	9
Exotoxinas.....	10
<i>Biofilm</i>	11
Epidemiología.....	11
Patogenia	13
Inmunología.....	14
Diagnóstico.....	15
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19

OBJETIVOS	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
Cepas bacterianas.....	21
Aislamiento bacteriano e identificación bacteriana	21
Extracción de ADN	22
Extracción de ADN a partir de cultivo bacteriano	22
Extracción de ADN a partir de órgano.....	22
Cuantificación de ADN	23
Diseño de oligonucleótidos.....	23
Serotipo 13.....	23
Serotipo 14.....	23
Procesamiento de las muestras para PCR.....	24
RESULTADOS	26
Secuenciación de las cepas de referencia	26
Estado de México	31
Jalisco	36
Puebla	41
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

SINOPSIS

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP) es una enfermedad que afecta a la especie porcina y es causada por la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). El índice de morbilidad es del 80% y el de mortalidad del 100%. Este agente tiene dos biotipos. El biotipo I (serotipos 1-12 y 15) ya ha sido identificado en México; sin embargo el biotipo II (serotipos 13 y 14) tiene características de crecimiento *in vitro* exigentes, razón por la que su identificación es un obstáculo en los laboratorios de diagnóstico. Se llevó a cabo un muestreo transversal en el rastro frigorífico La Paz, se colectaron un total de 69 muestras (tracto respiratorio) provenientes de 3 estados; Jalisco (24), Puebla (21) y Estado de México (24). Se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos para la identificación del serotipo 13 y 14. El estudio demostró la presencia del serotipo 13 en los tres estados, empleando la técnica de aislamiento bacteriano se identificaron como positivas al biotipo II; 9 muestras el Estado de México, 5 en Jalisco y 3 en Puebla; mientras que con la prueba de PCR 21 muestras fueron positivas en el Estado de México, 19 en Jalisco y 14 en Puebla, sólo para el serotipo 13. No fue posible identificar el serotipo 14.

INTRODUCCIÓN

La porcicultura es una actividad importante, principalmente en términos del valor económico, volumen de producción, la alta demanda por parte de la población y la capacidad generadora de empleos (Morilla, 2002).

Con la industrialización de la producción porcina, las enfermedades respiratorias se constituyeron en el principal problema sanitario en las explotaciones, debido a que se mantienen grandes concentraciones de cerdos en espacios relativamente reducidos, además de otros factores como el destete temprano segregado y la producción en diferentes sitios. En ocasiones se presentan de manera aguda, pero la mayor parte de las veces se presenta de manera crónica e insidiosa; esto provoca mayor gasto por concepto de adquisición de fármacos, vacunas y en consecuencia los animales no ganan el peso necesario para el mercado (Morilla, 2002).

El Complejo Respiratorio Porcino (CRP); se refiere a las enfermedades que generalmente se presentan en la etapa de crecimiento. Se identifican diferentes agentes virales, como los que ocasionan la enfermedad de Aujeszky, Ojo Azul, Circovirus tipo 2 e Influenza Porcina además del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS); así como bacterias, entre las cuales se tienen *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Salmonella choleraesuis* (Morilla, 2002).

Dentro de estas enfermedades respiratorias destaca la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP), causada por la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*).

Esta enfermedad se ha descrito alrededor del mundo, afecta a cerdos de todas las edades, sin embargo los animales de 12 semanas de edad son los más susceptibles. En los individuos infectados de manera endémica *App* se puede encontrar a partir de la cuarta semana de edad, mientras que su presencia en el tejido pulmonar y la inducción de lesiones pulmonares a menudo sólo se ve de las 12 a 16 semanas de vida (Chiers *et al.*, 2010).

El estrés, hacinamiento, el movimiento constante de los cerdos así como las situaciones climáticas adversas son factores de riesgo que contribuyen al desarrollo y a la persistencia de la enfermedad (Chiers *et al.*, 2010).

La PCP es extremadamente contagiosa, tiene morbilidad del 80% y mortalidad del 100%. Se caracteriza por ocasionar bronconeumonía fibrinohemorrágica necrotizante, bronconeumonía y pleuritis fibrinosa. Los animales que sobreviven a la infección presentan una pobre conversión alimenticia y permanecen como portadores crónicos. Un problema de esta enfermedad es que el animal puede ser tratado con antimicrobianos efectivos contra el agente, pero no pueden solucionarlo por la gravedad de las lesiones (Straw *et al.*, 2012).

Agente etiológico

Inicialmente se utilizó el nombre de *Haemophilus pleuropneumoniae* y también el de *Haemophilus parahaemolyticus*, estas designaciones se abandonaron y se incluyó esta especie en el género *Actinobacillus* tras demostrarse por estudios de homologación de ADN la estrecha relación con *A. lignieresii* (Straw *et al.*, 2012). La clasificación taxonómica vigente es la siguiente:

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pasteurellales

Familia: Pasteurellaceae

Género: Actinobacillus

Especie: A. pleuropneumoniae

El Manual Bergey's la clasifica dentro del subgrupo 3 del grupo 5, "bacilos Gram negativos anaerobios facultativos". Morfológicamente son bacilos cortos (0.4-1µm) pleomórficos solos o en cadenas, capsulado y presenta fimbria tipo 4 (Holt *et al.*, 1994).

Serotipos

Se clasifican por las características de su crecimiento *in vitro* de acuerdo a la necesidad de adenin dinucleotido de nicotinamida (NAD) como NAD dependiente (biotipo I) y NAD independiente (biotipo II).

El biotipo I incluye 13 serotipos basados en el antígeno capsular (1-12 y 15) y dos subtipos del serotipo 1 y 5 (1a, 1b y 5a, 5b) que tienen mínimas diferencias en la cápsula. El biotipo II se compone de los serotipos 13 y 14 (Bossé *et al.*, 2002, Chiers 2010).

Con base en las diferencias del antígeno capsular y antígenos solubles superficiales de los polisacáridos capsulares (CPS) y de los lipopolisacáridos (LPS) *App* se clasifica en 15 serotipos. Aunque todos los serotipos pueden causar enfermedad, existen diferencias en la virulencia (Chiers *et al.*, 2010). Sin embargo, Ito (2015) empleando la técnica de secuenciación demostró que, el biotipo I tiene 14 serotipos (1-13, 15), mientras que el biotipo II tiene siete (2, 4, 7, 9, 11, 13 y 14) que también se consideran como biotipo I. En el mismo año Gottschalk, reportó que algunas cepas de los serotipos 2, 4, 7, 9 y 11 pueden pertenecer al fenotipo del biotipo II y de forma reciente en América del Norte el serotipo 13 tuvo comportamiento fenotípico del biotipo I.

Se han descrito diferentes factores de virulencia, entre ellos hay 4 diferentes citotoxinas pertenecientes a la familia repeats in toxins (*RTX*), *ApxI*, *ApxII*, *ApxIII* y *ApxIV* que juegan un papel importante en la patogénesis de la infección (Gottschalk, 2015).

Algunos serotipos comparten antígenos comunes en el lipopolisacárido (LPS) de la cadena "O", estos antígenos se emplean en pruebas serológicas. Según la similitud de éstos se clasifican en tres grupos serológicos: los serotipos 1, 9 y 11; serotipos 3, 6, 8 y 15; serotipos 4 y 7. A pesar de que las estructuras de los LPS de los serotipos 4 y 7 son similares, la cepa de referencia de Europa muestra similitud con el serotipo 13; aunque no se han demostrado reacciones cruzadas entre estos serotipos empleando pruebas

serológicas. Por otro lado, el LPS del serotipo 13 de América del Norte presenta reacciones cruzadas con el serotipo 10 (Gottschalk, 2015).

Esta diversidad dificulta el éxito en los procesos de vacunación, debido a que vacunas de células completas generalmente confieren protección contra el serotipo homólogo; esto desencadena el desarrollo de nuevos inmunógenos.

Genoma

El genoma de *App* es circular, tiene tamaño aproximado de 2.4 Mpb, con un contenido en G+C de 42.1%. Se ha identificado el ADN plasmídico (Kang *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2002) con tamaño de hasta 6.0 Kb que contiene genes de resistencia a antibióticos.

Factores de virulencia

Varios productos, como estructuras (factores no secretados) han sido descubiertos como importantes factores de virulencia de *App*.

Polisacáridos capsulares (CPS)

Los polisacáridos capsulares (CPS) de *App* son estructuras específicas de serotipo responsables de la caracterización antigénica de los 15 serotipos diferentes (Jessing *et al.*, 2008). La cápsula es el componente primario que protege a la bacteria a partir de los mecanismos inmunes del huésped como la fagocitosis mediada por el complemento (Dubreuil *et al.*, 2000). Tiene carga negativa, se compone de unidades de oligosacáridos y polímeros de ácido teicoico unidos por enlaces de diéster de fosfato. La composición y estructura determina la variación de la virulencia entre cepas (Dubreuil *et al.*, 2000; Bandara *et al.*, 2003).

En general, los serotipos que poseen más carbohidratos en la cápsula tienden a ser más virulentos. La evaluación de cepas genéticamente idénticas sugirió que la cantidad y el tipo de CPS producido determina la virulencia de *App* (Bandara *et al.*, 2003). Dubreuil *et al.*, (2007) reportó que no encontró signos clínicos o lesiones pulmonares cuando por vía endobronquial administró a los cerdos la cápsula purificada. Aunque el CPS purificado de *A. pleuropneumoniae* no induce enfermedad clínica o lesiones

pulmonares en cerdos, la cápsula es esencial para que sea virulenta *in vivo*; pues permite resistir el medio ambiente antibacteriano producido por el sistema inmune del huésped. También empleo dos cepas del serotipo 5a de *A. pleuropneumoniae* (una con cápsula y la otra sin ella), la cepa con cápsula fue resistente a la actividad del complemento; mientras que la no encapsulada fue sensible.

Lipopolisacáridos (LPS)

Se ha demostrado que los LPS de *Haemophilus ducreyi* contribuyen en la adhesión a los queratinocitos humanos y que los de *Haemophilus influenzae* reducen la adherencia a células humanas del epitelio bronquial. En contraste, los LPS de muchos otros patógenos incluyendo *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, así como los de *Neisseria meningitidis* parecen no jugar ningún papel significativo en la adherencia a las células del huésped. En *App* juegan un papel importante en la adherencia, esto fue sugerido después de que se observó que las cepas que expresan LPS de tipo liso se adhirieron a cultivos de anillos traqueales porcinos en mayor número que los que tienen LPS de tipo semi-rugoso. Posteriormente se demostró que la adherencia bacteriana puede ser inhibida tanto por el LPS purificado como el fraccionado de alto peso molecular en masa y por un anticuerpo monoclonal de alto peso molecular (Bossé *et al.*, 2002).

Los glicoesfingolípidos que están presentes en el epitelio de las células respiratorias son los posibles receptores de los LPS de *App*. El LPS tanto purificado como y detoxificado de los serotipos 1 y 2 de *App*, se unen fuertemente al ganglio triacilceramida (GgO₃) y al ganglio tetra osylceramida (GgO₄); de forma significativa estas interacciones no fueron afectadas por los anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos O homólogos, lo que sugiere que los LPS están involucrados en la adhesión a GgO₃ y GgO₄; de cualquier modo. se debe tomar en cuenta que en los 15 serotipos hay variaciones en la longitud y la complejidad de las cadenas laterales "O" Bossé *et al.*, (2002) y Gyles *et al.* (2010). En el caso del serotipo 2 hay cepas que expresan típicamente el LPS liso, esto puede enmascarar la accesibilidad del oligosacárido en la interacción patógeno-huésped.

Los LPS de *A. pleuropneumoniae* mejoran los efectos de las toxinas *Apx* en los fagocitos; activan la producción de citocinas inflamatorias e inducen necrosis en células epiteliales pulmonares de cerdo a través de la unión a receptores tipo Toll, además de tener propiedades antifagocíticas (Chiers *et al.*, 2010).

Proteínas de membrana externa (PME)

Son importantes en la regulación de proteínas de superficie, en respuesta a las condiciones de crecimiento en el medio ambiente; pues se ha determinado su participación como receptores de elementos indispensables para el crecimiento, además; estas proteínas son capaces de inducir respuesta inmune.

Se han identificado varias PME y todos los serotipos contienen varias proteínas comunes, incluyendo una lipoproteína asociada al peptidoglicano llamada *PalA* que es modificable por calor, además de una de 48 kDa que no está presente en otras especies de bacterias Gram-negativas, relacionadas con la patogénesis del tracto respiratorio del cerdo (Verdugo *et al.*, 2003).

Mediante análisis proteómicos se observó que *App* tiene una membrana externa con alta similitud a la adhesina *YadA* que se involucra en la adherencia de *Yersinia*; esta adhesina se expresa en bacterias que presentan un alto grado de adhesión a las células del epitelio alveolar. También se ha reportado otra proteína que se une a los IV tipos de colágena que hay en el cerdo; además de un gen que codifica una adhesina de *App* el cual fue recuperado de tejido pulmonar necrótico (Chiers *et al.*, 2010).

Estudios realizados por Verdugo *et al.*, (2003) han demostrado que una proteína de membrana externa está presente en la mayoría de los serotipos pero no todos pueden interactuar con la colágena; puesto que los diferentes tipos de ésta con los que cuenta el cerdo no están presentes de manera constante ó pueden variar de acuerdo a la zona anatómica donde se encuentran.

App también puede interactuar con la fibronectina como otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* pues cuenta con una proteína llamada *ComE1* que le permite unirse a ella; además, puede unirse a una secuencia de la doble cadena de ADN de manera

independiente e inactivar el gen *ComE1* como pasa en el serotipo 15 (Gyles *et al.*, 2010).

Sistemas de captación de hierro

Dentro del aparato respiratorio, la disposición de hidratos de carbono y de otros nutrientes, están restringidos de tal modo que la capacidad para superar la limitación nutricional dentro del hospedero puede ser considerado un factor de virulencia.

Casi todas las bacterias requieren hierro para la supervivencia en concentraciones de $\sim 10^{-7}$ molar (M), este mineral es necesario para la función de las enzimas implicadas en el metabolismo bacteriano (por ejemplo, generación de ATP, respiración, replicación y reparación del ADN). En el huésped, las concentraciones de hierro libre pueden ser tan bajas como 10^{-18} M pues casi todo está vinculado a moléculas como transferrina, lactoferrina, haptoglobina y hemoglobina. *App* tiene diferentes sistemas de adquisición de hierro y puede utilizar compuestos hemo (incluyendo hemo libre, hemina, hematina y hemoglobina), así como la transferrina porcina, ferrocromo y sideroforos bis – catecol (Gyles *et al.*, (2010).

Existe un sistema de proteínas reguladoras en la captación de hierro (sistema *fur*). Al igual que en otras bacterias, dicho sistema interactúa con secuencias que están en la regiones promotoras que regulan la transcripción de hierro y también pueden participar de manera positiva en la regulación de algunos genes (Gyles *et al.*, 2010).

La supresión del gen *fur* tiene un efecto pleiotrópico. Las cepas *fur* mutantes se expresan constitutivamente y cuando se unen a proteínas crecen menos que las cepas de campo; debido a una acumulación de niveles tóxicos de hierro; esto también se observó en cepas *fur* mutantes que han sido atenuadas *in vivo*. Probablemente, se debe a que la tasa de crecimiento de éstas cepas es más lenta en comparación a la cepa de campo ó que la eliminación de las cepas con supresión del gen *fur* por parte del hospedero sea más rápida (Gyles *et al.*, 2010).

El sistema *fur* se une al receptor de hemoglobina *HbgA* el cual se encuentra en todos los serotipos de *App*. Un trabajo de Pawelek y Coulton (2004), sugieren que hay 2 giros

en la estructura de *HgbA*, probablemente estos son los responsables del reconocimiento y de la unión a la hemoglobina. Aunque las cepas con mutaciones en *HgbA* son capaces de infectar a lechones vía aerosol, los signos clínicos y las lesiones son menores que los ocasionados por la cepa de campo Gyles *et al.*, (2010).

Actinobacillus pleuropneumoniae tiene un sistema de represión del hierro que le ayuda a unirse a la transferrina de cerdo, pero no a la bovina, ovina, aviar, ni a la transferrina humana. Cuenta con dos proteínas (*TbpB* y *TbpA*), ambas forman un canal transmembranal y el hierro es eliminado de la transferrina por acción de este conjunto a través de la membrana externa, pues atraviesa el espacio periplásmico en la membrana citoplásmica para unirse a una tercera proteína denominada *TonB* (Gyles *et al.*, 2010).

Baltes *et al.*, (2002) reportaron que cepas del serotipo 7 con deleciones en *TbpB* y *TbpA* ó ambos, no son virulentas si se inoculan en aerosol. Las proteínas de unión a la transferrina son altamente inmunogénicas y pueden proporcionar una respuesta protectora para el serotipo específico Gyles *et al.*, (2010).

También tiene receptores específicos para ferrocromos, los cuales están sintetizados por el operon *FhuC*, a diferencia de los otros sistemas de captación de hierro, este no es regulado. La proteína *FhuA* es un receptor para ferrocromos y se ubica en la membrana externa; mientras que la proteína *FhuD* se ubica en el espacio periplásmico, ésta es la responsable de la translocación de hidroxamato férrico desde el medio exterior a la membrana interna; *FhuC* y *FhuB* forman un compuesto en la membrana citoplásmica asociado a un transportador denominado *ABC* que internaliza el hidroxamato férrico (Gyles *et al.*, 2010).

Todos los serotipos de *App* son capaces de obtener productos hemo a través de la producción de hemolisinas.

Proteasas

Tienen la capacidad de degradar la colágena porcina, inmunoglobulinas A y G. García *et al.*, (2000) menciona que *in vivo* estas proteasas se secretan al medio en vesículas que también tienen exotoxinas; además, produce ureasa cuya participación tiene lugar a largo plazo mediante la intervención sobre la respuesta inmune local y actúa sinérgicamente con la citotoxicidad de las toxinas *Apx* lo que permite mejorar la persistencia de todos los serotipos al afectar macrófagos alveolares.

Fimbria

Sirve para mediar la adherencia de las bacterias a las células del huésped. Son estructuras filamentosas que sobresalen de la superficie de la célula bacteriana, se ha observado que presenta una secuencia de aminoácidos en la región N-terminal con las características propias de las fimbrias de tipo IV; éstas son multifuncionales por sus características estructurales, pues participan en la competencia natural, adhesión y transporte de proteínas. Mide 0.5-2 nm de diámetro y 60-450 nm de longitud. Está compuesta de subunidades de aminoácidos de 15 a 20 kDa que se exportan desde la célula bacteriana para ser polimerizados y así formar una hebra fimbrial. Los 4 genes que la codifican (*apfA*, *ApfB*, *apfC* y *apfD*) son comunes en otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*; sin embargo; algo característico en *App* es que en el gen *ApfA* tiene alanina en el sitio 1 de escisión mientras que otras bacterias de la misma familia se tiene glicina en la misma posición (Bouke *et al.*, 2010).

Estos apéndices desaparecen con los primeros pasos *in vitro*, estimándose que su función es fundamental para la adherencia de la bacteria al epitelio respiratorio. Van Overbeke *et al.*, (2002), observaron que la expresión de la fimbria tipo IV unida a una proteína de membrana externa se relaciona con altos niveles de adhesión manejando condiciones de crecimiento bajas en NAD para los serotipos 2, 5a, 9 y 10; de los cuales el 5, 9 y 10 estuvieron desprovistos de fimbria mientras que el serotipo 2 no sufrió modificación alguna.

Bouke *et al.*, (2004) observaron que la fimbria no se expresó en los medios de cultivo estandarizados para el crecimiento de *App*, pero, cuando las células fueron depositadas en cultivos de células epiteliales de pulmón de cerdo se adhirieron exitosamente.

Exotoxinas

Son los factores más importantes que se relacionan con la severidad de las lesiones. Son proteínas con actividad tóxica que se secretan en el proceso infeccioso, dando como resultado la lisis de las células epiteliales alveolares, células endoteliales, eritrocitos, neutrófilos y macrófagos (Chiers *et al.*, 2010). *App* produce cuatro toxinas que pertenecen a la familia formadora de porinas *RTX*, se conocen como toxinas *Apx*. Las toxinas *RTX* se encuentran distribuidas entre la familia *Pasteurellaceae* y demuestran algún tipo de actividad citotóxica o citolítica (Bossé *et al.*, 2002); por lo tanto, el patrón fenotípico en la expresión de *Apx*, determina el grado de virulencia entre los diferentes serotipos.

ApxI es fuertemente hemolítica y citotóxica. Chien *et al.*, (2009) reportan la inducción a apoptosis de los macrófagos alveolares mediante esta toxina que participa a nivel de capasa 3. Por lo tanto, se puede decir que los serotipos con *ApxI* son los más virulentos. *ApxII* débilmente hemolítica y debilmente citotóxica. *ApxIII* no es hemolítica pero sí fuertemente citotóxica.

La expresión recombinante de *ApxIV* en *E. coli* mostró actividad débilmente hemolítica y sinergismo co-hemolítico con la esfingomielinasa (toxina) de *Staphylococcus aureus*, conocido como efecto CAMP (Bossé *et al.*, 2002), esta toxina sólo es producida *in vivo* y es altamente inmunogénica; por lo que se podría inferir que es capaz de desencadenar niveles de anticuerpos vacunales que confieren alto grado de protección contra una cepa de campo de cualquier serotipo.

Comparada con *ApxI*, *II* y *III*, *ApxIV* es única en las siguientes características: a) es producida por todos los serotipos de *App*, b) se expresa solamente *in vivo* (Liu *et al.*, 2009) y c) es altamente específica de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

En general, las toxinas *RTX* son codificadas por operones policistrónicos de 4 genes arreglados en el orden *CABD*, donde *A* codifica la pretoxina funcional, *C* codifica una proteína involucrada en la actividad post- traduccional de la pretoxina *B* y *D*, codifican las proteínas asociadas a membranas para efectos de secreción específica tipo I las cuales ubican activamente las toxinas *Apx* en el medio exterior. Los operones *Apx* son

estables en cepas de un serotipo dado, por lo que pueden ser correlacionados con aislamientos bacterianos según su producción toxigénica. *ApxI* y *ApxIII* son determinadas genéticamente por los operones *apxI/CABD* y *apxIII/CABD*; respectivamente, mientras que *ApxII* es determinada por *ApxCA* careciendo de B y D para su secreción. En tanto que *ApxIV*, es determinada por un solo gen *apxIVA*.

Biofilm

La colonización de los tejidos *in vivo* por parte de las bacterias esta mediada por la formación de *biofilm*; estos son colonias asociadas a una superficie ya sea abiótica o biótica que están en el interior de una sustancia polimérica extracelular que permite que a las colonias agregarse a la superficie. La producción de *biofilm* se ha descrito en todos los serotipos y por lo tanto juega un papel importante en la colonización. En un estudio publicado por Izano *et al.*, (2007) demostraron que la poli-N-acetilglucosamina es la principal adhesina en el *biofilm* de *App*. Buettner *et al.*, (2008) en condiciones *in vitro* regularon los genes implicados en la formación del *biofilm*, limitando una estricta respuesta a la expresión génica mediante la privación de un nutriente (maltosa) y observó que una cepa desprovista de esos genes era menos virulenta, por lo tanto la formación de *biofilm* fue pobre. Esta regulación también se observó después del contacto de *App* con cultivos celulares de epitelio pulmonar de cerdo. La formación de éstos puede aumentar la resistencia al sistema inmune del huésped, pues interfiere con la actividad fagocítica de los macrófagos a fin de impedir que los anticuerpos alcancen la superficie de las células bacterianas y por lo tanto, la disminución de la sensibilidad de estas células a la muerte por leucocitos polimorfonucleares.

Epidemiología

Los portadores sanos o crónicos representan la principal fuente de infección de cerdos susceptibles. El contacto directo nariz con nariz constituye el modo más importante de transmisión de la infección, aunque el polvo, gotas espiratorias y aerosoles son vehículos como lo reporta Torremorel en 2004, donde se demostró que la transmisión aérea era posible a un metro de distancia. Sin embargo, Kristensen en 2009, no fue capaz de demostrar la transmisión a esa distancia cuando menos del 10 %

del aire era transferido de un área contaminada a un área libre del patógeno, simulando lo que normalmente ocurre bajo condiciones naturales (Gyles *et al.*, 2010). La concentración bacteriana para provocar la enfermedad es de 10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) (Morilla, 2005).

Para la transmisión entre granjas, el organismo necesita permanecer en un estado húmedo, seco o sobre una superficie inanimada, esto fue reportado por Assavacheep *et al.*, (2012) donde se observó la sobrevivencia de *App* bajo condiciones controladas de laboratorio empleando un medio acuoso enriquecido con solución de cloruro de sodio y mucina; el resultado fue la sobrevivencia a temperaturas de refrigeración. En condiciones secas y/o húmedas *App* se mantuvo viable hasta 4 días después y bajo condiciones de congelación sobrevivió más de 17 semanas.

En la mayoría de los hatos con grandes poblaciones, predomina un solo serotipo, aunque se han demostrado diferentes serotipos en la misma granja (Chiers *et al.*, 2010).

En México, los serotipos 1a, 3, 5a, 5b y 7 son los que más se han reportado, en el primer caso se asocia con casos agudos de la enfermedad y los serotipos del biotipo II no han sido reportados (Serrano *et al.*, 2008). Sin embargo, Santiago *et al.*, *al* en 2013 reporta el aislamiento y la identificación del biotipo II empleando pruebas bioquímicas básicas y de rutina para el diagnóstico.

Se considera, que la baja tasa de aislamiento del biotipo II se asocia a una subestimación por parte de los laboratorios que no están familiarizados con este grupo, debido a que *in vitro* presenta un crecimiento NAD independiente. El aislamiento del serotipo 14 del biotipo II sólo se ha reportado en Dinamarca. Maldonado *et al.*, (2009) reportaron que en España el serotipo 14 estaba implicado en brotes de PCP; así como los serotipos 2, 4, 7, 11 y 13, esto sugiere que el biotipo II puede tener potencial debido al constante movimiento de cerdos. Sin embargo, algunas cepas de los serotipos 2, 4, 7, 9 y 11 pueden pertenecer al fenotipo del biotipo II y recientemente en América del Norte el serotipo 13 tuvo comportamiento del biotipo I (Ito, 2015).

A pesar de que la PCP resulta el efecto patológico más conocido de *App*, no se descarta totalmente su posible implicación como factor etiológico en otros trastornos

como la otitis. Ohba *et al.* (2008) reportaron la presencia de esta bacteria en otros órganos no pertenecientes al sistema respiratorio porcino, como encéfalo, riñón, corazón y tejido óseo.

Por lo que respecta a la especificidad de hospedarse, es prácticamente total para la especie porcina.

Patogenia

La infección se puede presentar por aerosoles o por contacto directo. Estudios experimentales han comprobado que el microorganismo puede colonizar tonsilas y adherirse al epitelio alveolar. Cuando los animales están inmunosuprimidos este agente puede llegar a pulmón, donde es fagocitado o adherido a macrófagos alveolares. Las hemolisinas dañan a los eritrocitos para obtener hierro desde el grupo hem, mientras que las citotoxinas dañan macrófagos y neutrófilos. Aunque para el epitelio alveolar todos los serotipos son patógenos, la toxina *ApxIII* es en particular activa contra macrófagos alveolares pulmonares y macrófagos intravasculares pulmonares. La infección se acompaña de la producción de citocinas como IL-1 y , IL-6 e IL-8 además del Factor de Necrosis Tumoral (FNT). Esto genera la producción de radicales libres que son los responsables del daño en el parénquima pulmonar. Además las toxinas *Apx* activan a la cascada de la coagulación, con la posterior activación de las plaquetas y la formación de microtrombos. Con frecuencia se observan diferencias en la virulencia en los distintos serotipos o aún en un solo serotipo. Así que de este modo se generan los procesos de vasculitis, trombosis, edema, necrosis y hemorragias características sobre la superficie pulmonar.

Las lesiones pulmonares resultantes de los cambios tóxicos pueden verse desde las 3 horas posteriores a la infección experimental y se vuelven cada vez más evidentes. La pared alveolar se vuelve edematosa y hay desarrollo de congestión capilar. Los vasos linfáticos se dilatan produciendo edema, acumulación de fibrina y de células inflamatorias. Se pueden ver micro colonias del agente en el alveolo infectado y puede producirse bacteremia. Los bordes de las lesiones pueden delimitarse por macrófagos muertos y dañados o detritus celulares a los 4 días post-infección. En los bronquios

está presente un exudado purulento que contiene microorganismos. Con el tiempo la lesión se vuelve necrótica y se produce una reparación por fibrosis que puede durar entre 12 y 14 semanas.

Otro componente de la bacteria en la patogenia es la cápsula, que la protege de los anticuerpos, el complemento y la fagocitosis mediada por los PMNs. A su vez las adhesinas permiten la fijación de *App* al epitelio de las criptas tonsilares, de la tráquea y de los alvéolos, además de producir proteínas captadoras de hierro cuando éste se encuentra en baja concentración en el medio, situación que ocurre normalmente *in vivo*. A su vez, tanto el LPS como las proteínas de la membrana externa son capaces de captar la hemoglobina liberada por los eritrocitos destruidos. Otro de los factores relacionados con la patogenicidad son los genes del metabolismo anaeróbico. Se generaron deleciones del gen que codifica para la dimetil sulfóxido reductasa de *App*, enzima esencial para que la bacteria se desarrolle en ambientes anaeróbicos generando una disminución en los procesos agudos, al disminuir la capacidad de colonización (Baltes *et al.*, 2003).

Si a todos los componentes involucrados en la virulencia y patogénesis se le suma la respuesta inmune de los cerdos que rechazan el establecimiento de la bacteria, se tiene como resultado una enfermedad que puede ir de sobreaguda a crónica. Caracterizada por una neumonía fibrino-hemorrágica necrotizante con trombosis vascular y una pleuritis fibrinosa (Chiers *et al.*, 2010. Ruiz *et al.*, 2011).

La infección experimental o natural estimula una respuesta inmune y pueden detectarse anticuerpos circulantes, dentro de los 10 a 14 días post-infección, que alcanzan un nivel máximo dentro de las 4 a 6 semanas posterior a ella (Morilla, 2005. Straw *et al.*, 2002).

Inmunología

En animales sanos los macrófagos (alveolares, intersticiales e intravasculares) son los fagocitos predominantes del tracto respiratorio inferior; mientras que el número de polimorfonucleares es pequeño y aumenta rápidamente después de la infección.

Los macrófagos alveolares (AMs) están estratégicamente situados en la superficie de los alvéolos y por lo tanto, son las primeras células de defensa. Los macrófagos pulmonares intravasculares (IMs) se adhieren a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y son rápidamente recluidos a las áreas de inflamación o de necrosis en pulmones de cerdos infectados con *App*. Estos dos tipos de macrófagos tienen diferentes funciones, los IMs tienen predominantemente una función citolítica, mientras que los AMs son fagocíticos.

Actinobacillus pleuropneumoniae tiene acción proteolítica sobre inmunoglobulinas cuya acción interfiere en la opsonización y fagocitosis. Negrete *et al.*, (2000) observaron que a partir de sobrenadantes de cultivo de *App* hubo actividad proteolítica sobre IgA, pero no sobre IgG.

La fagocitosis constituye el mejor mecanismo de defensa frente a la colonización bacteriana, sin embargo, ciertos componentes de *App* interfieren con este proceso. Las hemolisinas son citotóxicas para macrófagos y neutrófilos, la cápsula tiene propiedades antifagocíticas además que los anticuerpos producidos son altamente específicos de serotipo.

Diagnóstico

Se puede realizar mediante diversas metodologías. El diagnóstico clínico anatomopatológico, por observación de signos y lesiones típicas, se utiliza en casos agudos, subagudos o crónicos de la enfermedad, pero no es posible emplearlo para la detección de infecciones subclínicas, el diagnóstico bacteriológico complementa al anterior, constituyendo un diagnóstico de certeza que no discrimina, a menos que se utilicen técnicas moleculares se puede identificar al serotipo causante de la enfermedad. El diagnóstico serológico es de utilidad para determinar presencia o ausencia de infección, pero no es eficiente para realizar diagnóstico etiológico en brotes agudos en granjas que por primera vez son infectadas. Así que se deben de tomar en cuenta las necesidades y situación epidemiológica del problema.

Actinobacillus pleuropneumoniae tiene gran complejidad debido a la existencia de varios serotipos. De tal modo que en una misma granja pueden coexistir varios serotipos y otras bacterias relacionadas, así que el diagnóstico serológico contempla tres muestras serológicas:

- a. Específicas para serotipo o serogrupo. Usa como antígeno el LPS altamente purificado que puede identificar serotipos (como 2, 5, 10, 12 y 14) ó serogrupos (como 1, 9, 11; 3, 6, 8; 4, 7 y 15). Normalmente para reducir los costos, se estudian los serotipos más importantes causantes de los signos clínicos en el país. La prueba de fijación del complemento (no está disponible comercialmente) se usa muy poco en los laboratorios y presenta alta especificidad pero muy baja sensibilidad, además, es exigida por algunos países (Rusia y China) como prueba de referencia para la importación de animales, la desventaja que presenta es su dificultad de estandarizar.
- b. Detección de todos los serotipos. Se basa en la detección de *Apx/V* pues ésta toxina está presente en todos los serotipos. Se utiliza principalmente para el monitoreo de granjas con un alto nivel de salud. Al utilizar esta prueba pueden arrojar resultados positivos ya que la mayoría de las granjas están infectadas subclínicamente con serotipos de una virulencia relativamente baja. Estos resultados positivos deben ser confirmados con serotipos/serogrupos específicos en las pruebas de ELISA para determinar cuáles son los serotipos virulentos que están presentes o no en la granja analizada. Esta prueba detecta anticuerpos producidos contra un antígeno solamente *in vivo*. Esto significa que los anticuerpos detectados con esta prueba no están asociados a una vacuna, a menos que sea una vacuna atenuada.
- c. Las que diferencian una mezcla de serotipos basados en algunos antígenos comunes. Utilizan como antígenos las toxinas *Apx/I* y *Apx/II*, así que los serotipos que producen éstas pueden ser detectados; la existencia de falsos positivos debe de tenerse en cuenta, ya que otras especies bacterianas también son capaces de producirlas.

Los cerdos que presenten resultados serológicos positivos serán candidatos para hacer otro tipo de pruebas, como, detección del antígeno: aislamiento bacteriano y detección del ADN. Las tonsilas son las mejores muestras para ser analizadas, ya que *App* invade las criptas de éste órgano. Hay pruebas que se han desarrollado basadas en la utilización de bolitas inmunomagnéticas y que tienen una alta sensibilidad pero tienen la desventaja de ser caras. Si una colonia aparentemente de *App* se aísla de tonsila o de pulmón, ésta debe de ser confirmada por PCR específico para *App*, ya que hay agentes similares que por medio de pruebas bioquímicas tradicionales pueden dar resultados falsos positivos.

La detección de ADN por PCR es usada frecuentemente; sin embargo, esta requiere la validación, algunas son capaces de detectar todos los serotipos de *App*. Se han desarrollado pruebas de PCR para serotipos específicos, pero aún no son validadas en la práctica. La detección por PCR se ha realizado directamente de las muestras o después del cultivo de éstas, donde la sensibilidad y la especificidad ha sido variable (Gottschalk M. 2012)

Justificación

Es prioritario desarrollar pruebas de diagnóstico eficientes para la identificación del biotipo II de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, aunque se ha reportado la presencia de ambos, en algunos países el biotipo II ha sido considerado más patógeno que el biotipo I. Además de que las pruebas rutinarias para el diagnóstico del biotipo II no son sensibles ni específicas para biotipificarla y serotipificarla.

Hipótesis

Es posible localizar el biotipo II de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en algunos estados de la República Mexicana con la utilización de pruebas más sensibles y específicas como la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Objetivos

Objetivo general

Identificar la circulación del Biotipo II de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en algunos estados de la República Mexicana mediante la prueba de PCR.

Objetivos específicos

Estandarización de la prueba de PCR para la identificación del Biotipo II de *App*.

Localizar geográficamente los Estados de la República Mexicana donde circula el biotipo II.

Identificar que serotipo del biotipo II es el de mayor prevalencia.

Material y Métodos

Se llevo a cabo un muestreo transversal por disponibilidad en el rastro frigorífico La Paz S.A. de C.V. ubicado en el Km. 21.5 de la carretera federal libre México-Puebla en el municipio de Los Reyes, La Paz en el Estado de México. Se colectaron un total de 69 muestras (tracto respiratorio) provenientes de 3 estados de la República Mexicana: Jalisco (24), Puebla (21) y Estado de México (24).

El criterio para la selección de las muestras, fue la presencia de lesiones neumónicas necróticas, fibrinohemorrágicas y pleuritis fibrinosa, presentes en cualquier lóbulo pulmonar. Se realizó la extracción del ADN por medio de un kit comercial, para después someterse a PCR con oligonucleótidos específicos del gen de la proteína de membrana externa *OmlA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* del serotipo 13 y 14.

Los análisis fueron realizados en el laboratorio de Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia así como en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Cepas bacterianas

Se emplearon 2 cepas de referencia representativas del serotipo 13 (N273) y 14 (3906) proporcionadas por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, además, de las 69 muestras disponibles para la detección del biotipo II.

Aislamiento bacteriano e identificación bacteriana

Las muestras colectadas se sembraron mediante la técnica de estría cruzada, bajo condiciones de esterilidad en agar gelosa sangre con y sin estría nodriza de *Staphylococcus aureus*, durante 24 hrs., a una temperatura de incubación de 37° C y de 5-10 % de CO₂. Aquellas colonias con crecimiento NAD independiente, brillantes, convexas, de 1 mm de diámetro y Gram positivas se pasaron a agar PPLO (*Mycoplasma* agar), se realizaron una serie de pruebas bioquímicas verificadas con los resultados esperados para *App*. Se cosecharon 5 colonias en 1 mL de caldo BHI (*brain*

heart infusion) y se incubaron durante 12 hrs. para obtener un cultivo saturado de bacterias, mismo que se mantuvo en congelación hasta la extracción de ADN; de igual modo se tomaron porciones de estas mismas muestras para una PCR directa de órgano.

Extracción de ADN

Extracción de ADN a partir de cultivo bacteriano

Se realizó como lo indica el Mini Kit QIAamp DNA de Qiagen®. El saturado de bacterias se centrifugó a 7 500 g por 5 minutos. Se agregaron a la pastilla 180 µL de buffer ATL y 20 µL de proteinasa K, fueron mezclados mediante agitación y se mantuvo a 56°C por 3 hrs. en incubadora seca. Se añadieron 200 µL de buffer AL y se mezclaron con vórtex por 15 seg. se incubó a 70°C durante 10 min. Se adicionaron 200 µL de etanol al 100% y se mezclaron con agitador Vórtex Genie 2 Scientific Industries® por 15 seg., el contenido se transfirió a una columna y se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 min; el contenido fue desechado. La columna se cambió a un tubo limpio y se adicionaron 500 µL de buffer AW1, se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min y el contenido fue desechado una vez más. Se cambio la columna otra vez a un tubo limpio y se añadieron 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó a 14 000 rpm durante 3 min (este último paso se repitió dos veces). La columna se cambio a un tubo limpio y se adicionaron 200 µL de buffer AE y se incubó a temperatura ambiente durante 1 min, se centrifugo 1 minuto a 8000 rpm. Este paso se repitió 1 vez más y se obtuvo un volumen final de 400 µL.

Extracción de ADN a partir de órgano

De las muestras de pulmón se pesaron 25 mg. mismos que se maceraron con nitrógeno líquido. Se siguieron las indicaciones de los protocolos para la extracción de DNA a partir de tejido como lo señala el Mini Kit QIAamp DNA® y QIAamp® cador® pathogen de Qiagen®, al final del procedimiento se obtuvieron 400 µL mismos que se emplearon para la técnica de PCR.

Cuantificación de ADN

Se cuantificó el ADN con la ayuda de un kit comercial Qubit dsDNA HS assay kit® y se siguieron las instrucciones según el protocolo indicado, esto con la finalidad de conocer la cantidad de ADN presente en la extracción para el posterior desarrollo del PCR.

Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos con la ayuda del programa Primer® que corresponden al gen *OmlA* de la proteína de membrana externa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* tanto del serotipo 13 como del 14. Las secuencias seleccionadas se analizaron mediante Clone manager® y MEGA 7® para determinar la especificidad de los primers; ya verificada ésta se mandaron a sintetizar.

Serotipo 13

- Forward. AGAGGTAAGATGCTATATGG iniciando en la posición 810 y terminando en la posición 829.
- Reverse. CCATCCTTATCAACTACAAC iniciando en la posición 990 y terminando en la posición 1009.

Con un amplicón esperado de 523 pb.

Serotipo 14

- Forward. CCATTACAGTCGCATTAGAT iniciando en la posición 560 y terminando en la posición 579.
- Reverse. GAAGTTAGCGTCAGGAGTTA iniciando en la posición 1064 y terminando en la posición 1083.

Con un amplicón esperado de 161 pb.

Procesamiento de las muestras para PCR

La técnica de PCR se estandarizó con reactivos de Biotecmol® empleando los siguientes; en volumen total de 20 ul, quedando de la siguiente manera:

1. Agua DEPC12.4 ul
2. Oligonucleotidos (F+R).....2 ul
3. DNTPs..... 0.4ul
4. Buffer.....2 ul
5. Magnesio.....1 ul
6. Taq polimerasa.....0.2 ul
7. Muestra (extracción de ADN).....2 ul

La reacción se realizó en un termociclador Labnet® con los siguientes parámetros:

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos
Desnaturalización	94 °C	30 segundos, 30 ciclos
Alineación	Serotipo 13: 56 °C Serotipo 14: 32.5 °C	1 minuto, 30 ciclos
Extensión	72°C	30 segundos, 30 ciclos
Extensión final	72°C	5 minutos

Una vez obtenido el producto de PCR, de cada reacción se colectaron 5 uL con 2 uL de buffer de carga 6X DNA loading, de Thermo Scientific® para ser analizados por electroforesis, con un gel de agarosa al 3% con amortiguador TAE 1X; se corrió a 90

volts en cámara horizontal de electroforesis durante 50 minutos. Posteriormente se tiñó con red gel y se visualizó en un transiluminador UV de Kodak identificando los amplicones generados con ayuda del marcador de peso molecular ADN pBR322/ Msp I®.

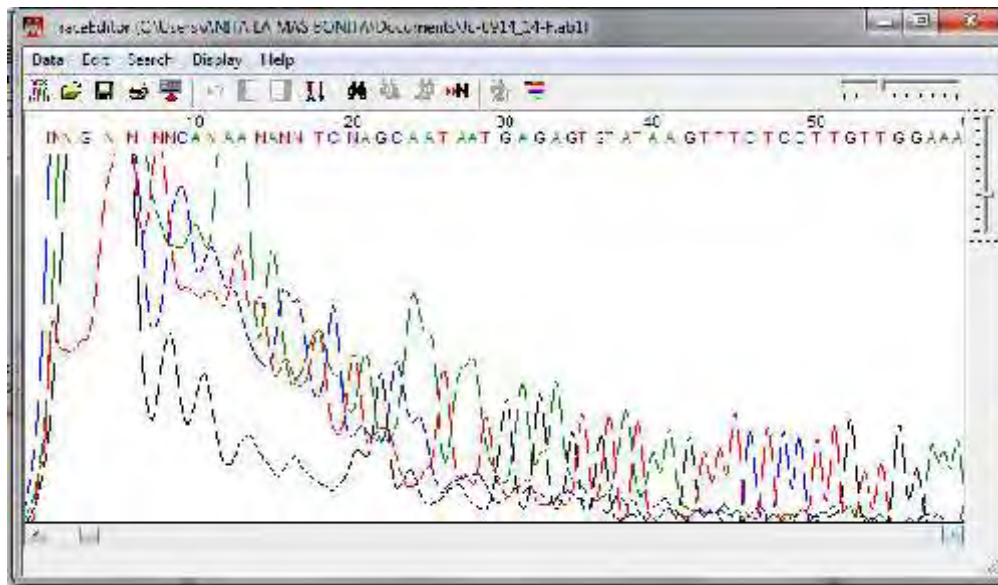
Resultados

Durante la estandarización de la técnica de PCR fueron identificadas diferentes temperaturas de alineación para ambos serotipos, generándose amplicones de tamaño aproximado al esperado. Para verificar que los resultados obtenidos fueran correctos; los productos de PCR fueron mandados a secuenciar.

Secuenciación de las cepas de referencia

Los resultados de secuenciación emitidos por el Instituto de Fisiología Celular para la cepa (N273) del serotipo 13 corresponden a *Mannheimia phage* (Figura 1-3).

Figura 1. Resultados de la secuenciación de la cepa de referencia del serotipo 13 (N273) analizados con MEGA.



El cromatograma muestra las bases identificadas por diferentes fluorocromos que indican la secuencia de nucleótidos.

Figura 2. Resultados gráficos del análisis BLAST para la secuenciación de la cepa de referencia del serotipo 13 (N273).

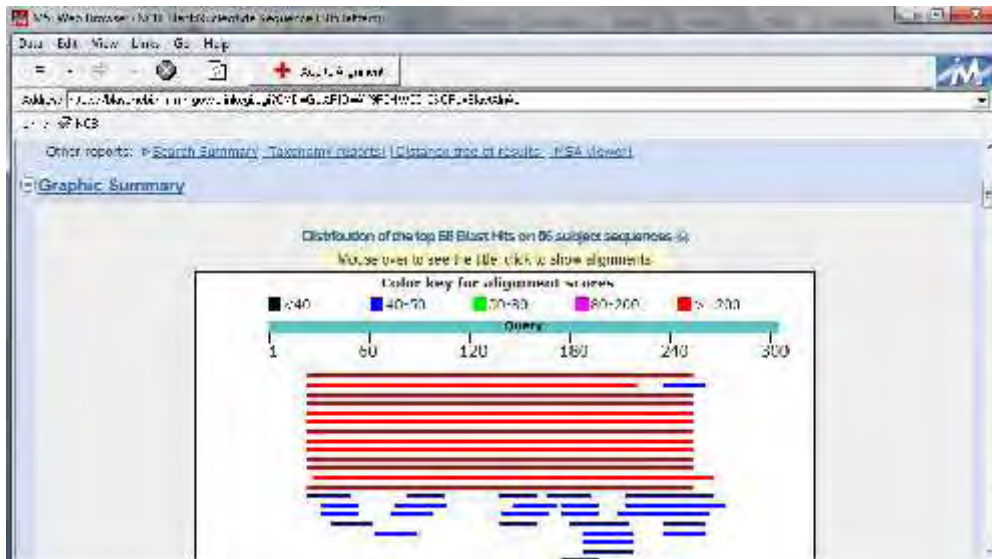


Figura 3. Descripción de las alineaciones producidas como resultado a la secuencia de la cepa de referencia del serotipo 13 (N273).

Sequences producing significant alignments:

Select: **All** None Selected 0

Alignments

Description	Max score	Total matches	Query cover	E-value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 411216 (J17411), complete genome	226	226	100%	0e-50	100%	U0138602.1 J17411.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria hermocidica D-21, complete genome	223	223	100%	0e-51	100%	U0138601.1 D-21.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A1, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138603.1 WRS_3827A1.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A2, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138604.1 WRS_3827A2.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A3, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138605.1 WRS_3827A3.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A4, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138606.1 WRS_3827A4.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A5, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138607.1 WRS_3827A5.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A6, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138608.1 WRS_3827A6.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A7, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138609.1 WRS_3827A7.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A8, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138610.1 WRS_3827A8.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A9, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138611.1 WRS_3827A9.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A10, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138612.1 WRS_3827A10.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A11, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138613.1 WRS_3827A11.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A12, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138614.1 WRS_3827A12.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A13, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138615.1 WRS_3827A13.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A14, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138616.1 WRS_3827A14.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A15, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138617.1 WRS_3827A15.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A16, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138618.1 WRS_3827A16.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A17, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138619.1 WRS_3827A17.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A18, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138620.1 WRS_3827A18.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A19, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138621.1 WRS_3827A19.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A20, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138622.1 WRS_3827A20.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A21, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138623.1 WRS_3827A21.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A22, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138624.1 WRS_3827A22.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A23, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138625.1 WRS_3827A23.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A24, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138626.1 WRS_3827A24.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A25, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138627.1 WRS_3827A25.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A26, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138628.1 WRS_3827A26.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A27, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138629.1 WRS_3827A27.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A28, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138630.1 WRS_3827A28.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A29, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138631.1 WRS_3827A29.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A30, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138632.1 WRS_3827A30.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A31, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138633.1 WRS_3827A31.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A32, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138634.1 WRS_3827A32.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A33, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138635.1 WRS_3827A33.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A34, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138636.1 WRS_3827A34.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A35, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138637.1 WRS_3827A35.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A36, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138638.1 WRS_3827A36.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A37, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138639.1 WRS_3827A37.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A38, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138640.1 WRS_3827A38.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A39, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138641.1 WRS_3827A39.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A40, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138642.1 WRS_3827A40.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A41, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138643.1 WRS_3827A41.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A42, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138644.1 WRS_3827A42.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A43, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138645.1 WRS_3827A43.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A44, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138646.1 WRS_3827A44.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A45, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138647.1 WRS_3827A45.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A46, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138648.1 WRS_3827A46.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A47, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138649.1 WRS_3827A47.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A48, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138650.1 WRS_3827A48.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A49, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138651.1 WRS_3827A49.1
<input type="checkbox"/> Mantecaria phage 98 WRS 3827A50, complete genome	217	217	100%	0e-50	100%	U0138652.1 WRS_3827A50.1

Respecto a la cepa 14 (3906) los resultados corresponden a *Acinetobacter schindleri*, como lo muestran las Figuras 4-6.

Figura 4. Resultados de la secuenciación de la cepa de referencia del serotipo 14 (3906) analizados con MEGA.

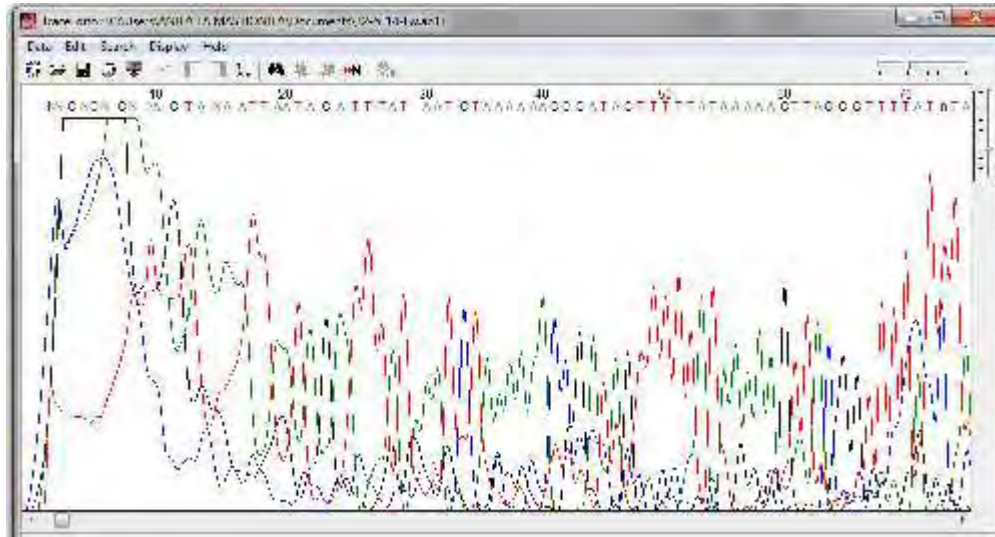
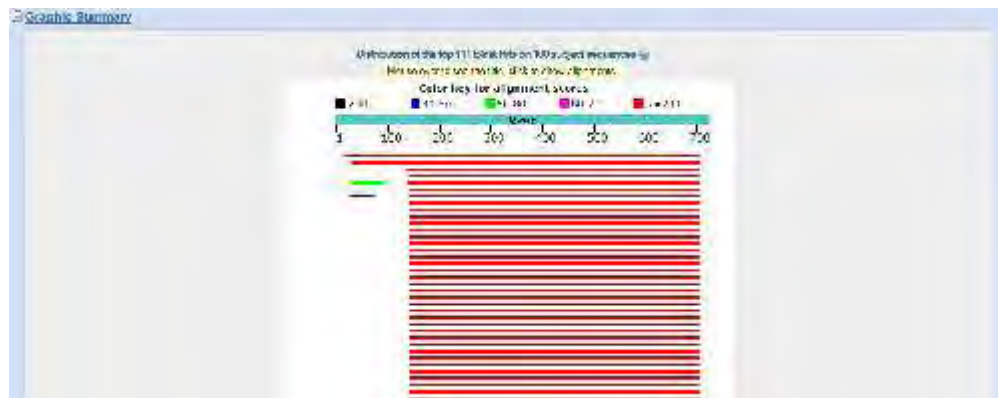


Figura 5. Resultados gráficos del análisis BLAST para la secuenciación de la cepa de referencia del serotipo 14 (3906).



Se realizó el PCR empleando ADN genómico, previamente purificado de cada cepa de referencia.

En este estudio se logró detectar e identificar el serotipo 13 del biotipo II de *Actinobacillus pleuropneumoniae* mediante la técnica de PCR, no por esto se deben descartar los métodos tradicionales de diagnóstico, se deben realizar de forma conjunta.

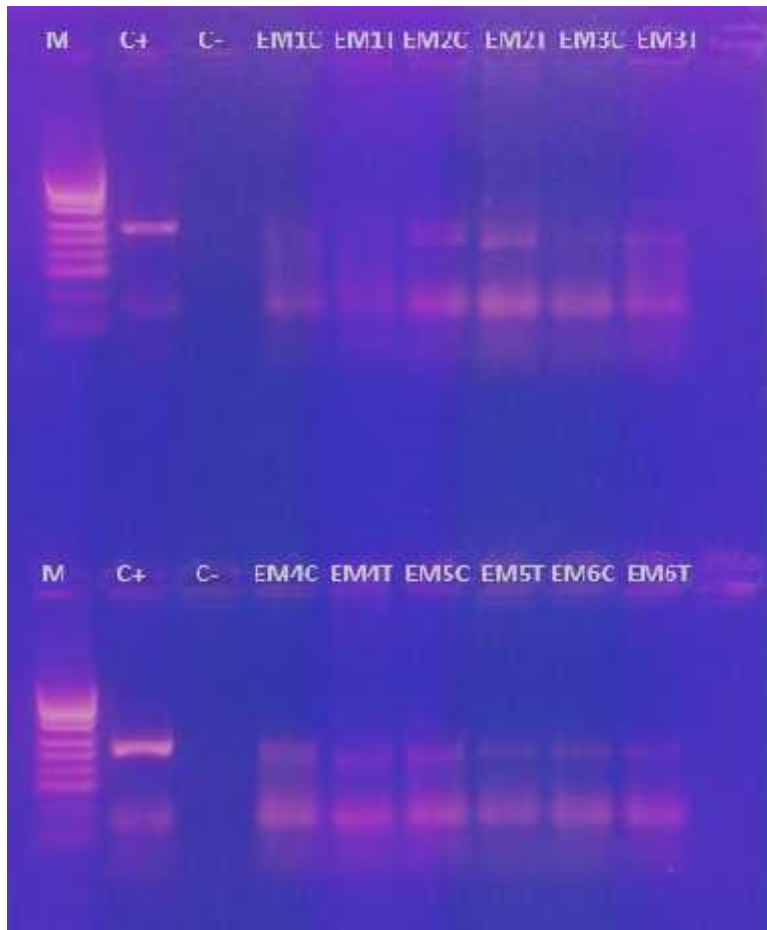
Estado de México

De los 24 pulmones obtenidos; sólo 11 fueron positivos a identificación bacteriana (identificados como Edo. de Méx. 1-11); de éstos se realizó la extracción de ADN del cultivo bacteriano, solamente nueve muestras fueron positivas a PCR (2-10) y dos negativas (1 y 11) como lo resume el cuadro 1 y en la Figura 10 y 11.

Cuadro 1. Tabla de 2x2 que presenta la frecuencia de muestras positivas y negativas para la prueba de aislamiento bacteriano y de PCR a partir del ADN de cultivo bacteriano del Estado de México (1-11).

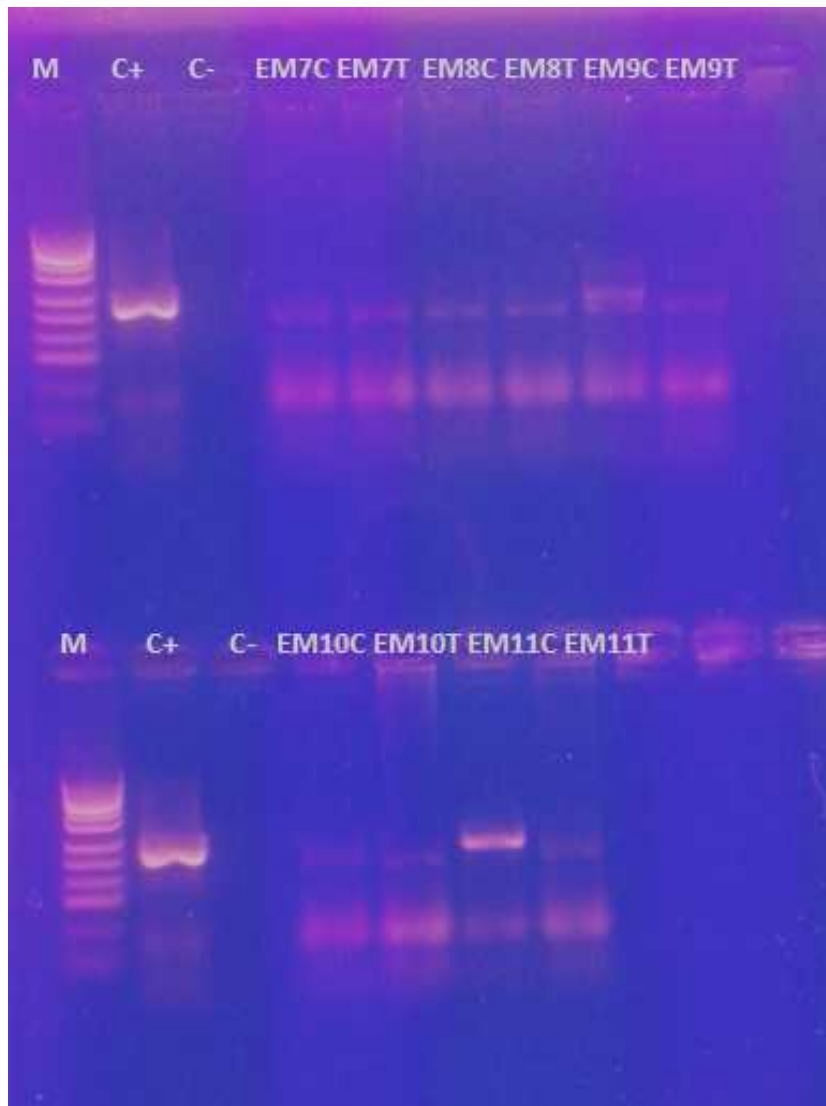
		ADN de cultivo bacteriano		
		Aislamiento bacteriano		
		+	-	
PCR	+	9	0	9
	-	2	0	2
		11	0	11

Figura 10. Gel de agarosa al 3%. Muestra 1-6 del Estado de México.



M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, EM: Estado de México, C: ADN de cultivo bacteriano, T: ADN de tejido pulmonar.

Figura 11. Gel de agarosa al 3%. Muestra 7-11 del Estado de México.



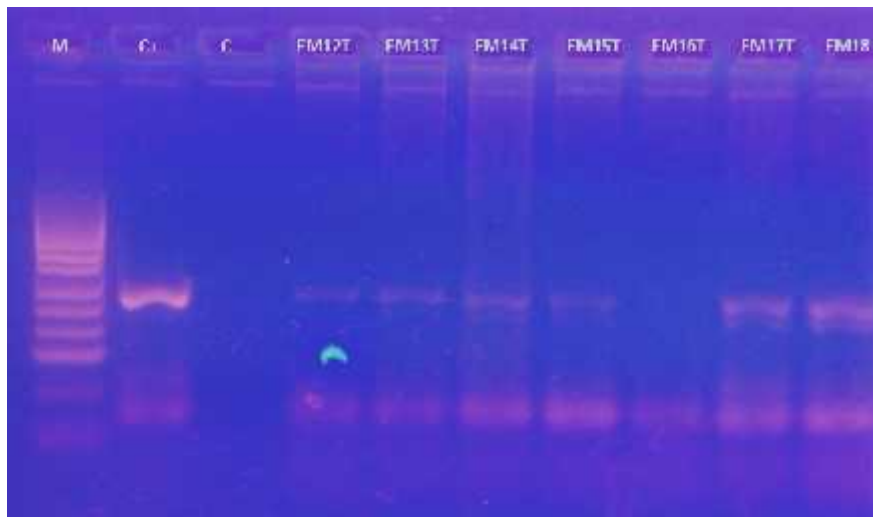
M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, EM: Estado de México, C: ADN de cultivo bacteriano, T: ADN de tejido pulmonar.

En el Cuadro 2 y Figura 12 y 13, se detalla el resultado de los 13 pulmones negativos (Edo. de Méx. 12-24) a identificación bacteriana, así, que sólo se realizó la extracción de ADN de tejido pulmonar para realizar PCR. Once muestras fueron positivas a PCR (12-15, 17, 18, 20-24); mientras que dos fueron negativas a la misma prueba (16,19).

Cuadro 2. Tabla de 2x2 que presenta la frecuencia de muestras positivas y negativas para la prueba de aislamiento bacteriano y de PCR a partir del ADN de tejido pulmonar del Estado de México (1-24).

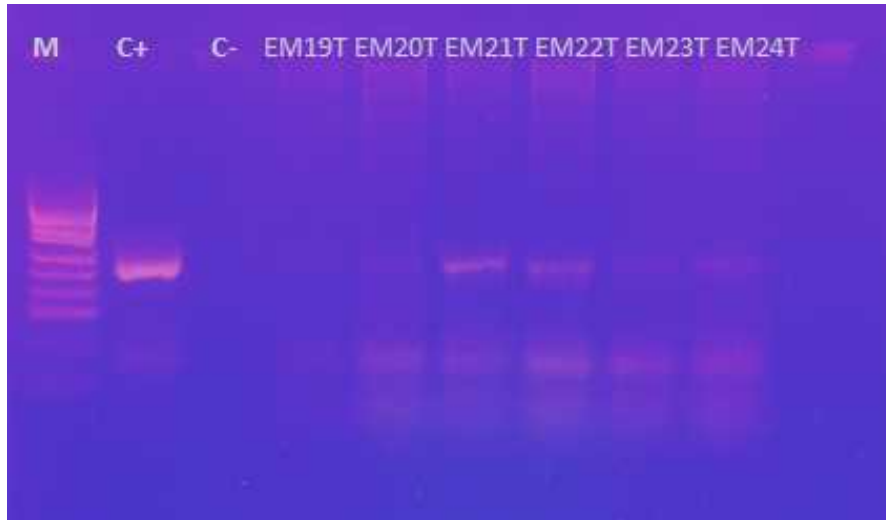
		ADN de tejido pulmonar		
		Aislamiento bacteriano		
		+	-	
PCR	+	10	11	21
	-	1	2	3
		11	13	24

Figura 12. Gel de agarosa al 3%. Muestra 12-18 del Estado de México.



M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, EM: Estado de México, T: ADN de tejido pulmonar.

Figura 13. Gel de agarosa al 3%. Muestra 19-24 del Estado de México.



M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, EM: Estado de México, T: ADN de tejido pulmonar.

De los 24 pulmones, el 88% fue positivo a la presencia del serotipo 13; de éstas, sólo 9 muestras fueron positivas a aislamiento bacteriano y a PCR, mientras que 11 sólo fueron positivas con PCR.

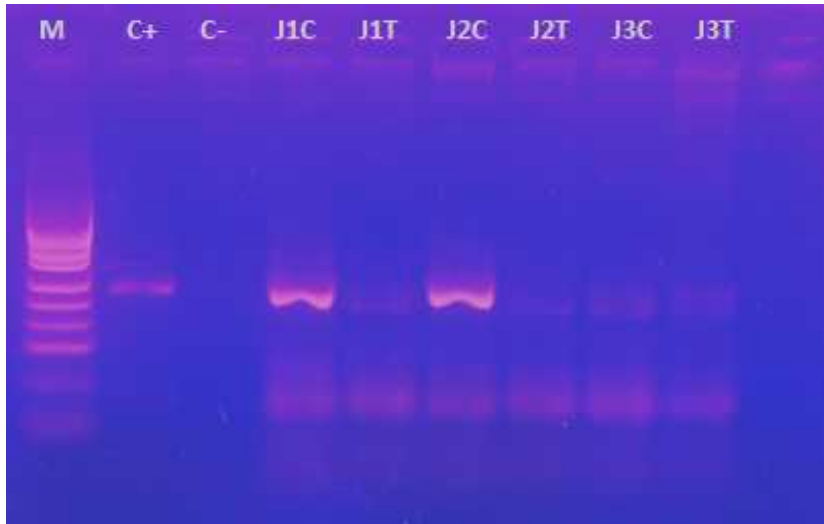
Jalisco

De los 24 pulmones obtenidos, sólo 5 fueron positivos a identificación bacteriana (identificados como Jalisco1-5); de éstos se realizó la extracción de ADN del cultivo bacteriano; las 5 muestras fueron positivas a PCR (1-5) como lo ejemplifica el Cuadro 3. Igualmente, se realizó la extracción de ADN de pulmón y todos fueron positivos a PCR (Figura 14 y 15).

Cuadro 3. Tabla de 2x2 que presenta la frecuencia de muestras positivas y negativas para la prueba de aislamiento bacteriano y de PCR a partir de ADN de cultivo bacteriano del estado de Jalisco (Jalisco 1-5).

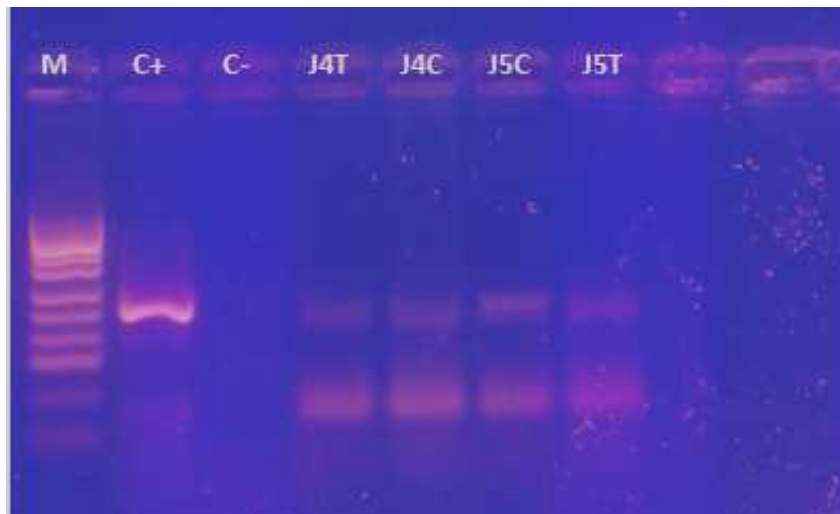
		ADN de cultivo bacteriano		
		Aislamiento bacteriano		
		+	-	
PCR	+	5	0	5
	-	0	0	0
		5	0	5

Figura 14. Gel de agarosa al 3%. Muestra 1-5 de Jalisco.



M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, J: Jalisco, C: ADN de cultivo bacteriano, T: ADN de tejido pulmonar.

Figura 15. Gel de agarosa al 3%. Muestra 4 y 5 de Jalisco.



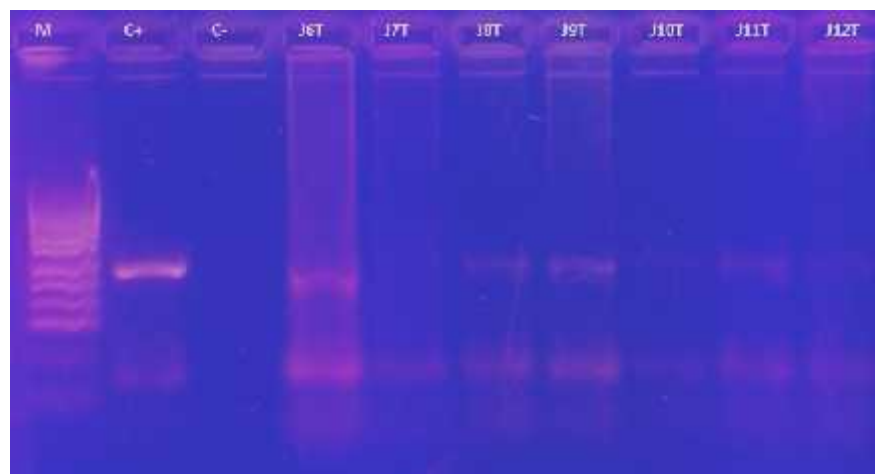
M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, J: Jalisco, C: ADN de cultivo bacteriano, T: ADN de tejido pulmonar.

De los 19 pulmones negativos (Jalisco 6-24) a la identificación bacteriana, se realizó la extracción de ADN de pulmón, 14 fueron positivos con PCR (8-11, 14-20, 22-24) y 5 negativos (6, 7, 12,13 y 21) como lo detalla el Cuadro 4 y las Figuras 16-18.

Cuadro 4. Tabla de 2x2 que presenta la frecuencia de muestras positivas y negativas para la prueba de aislamiento bacteriano y de PCR a partir del ADN de tejido pulmonar del estado de Jalisco (Jalisco 1-24).

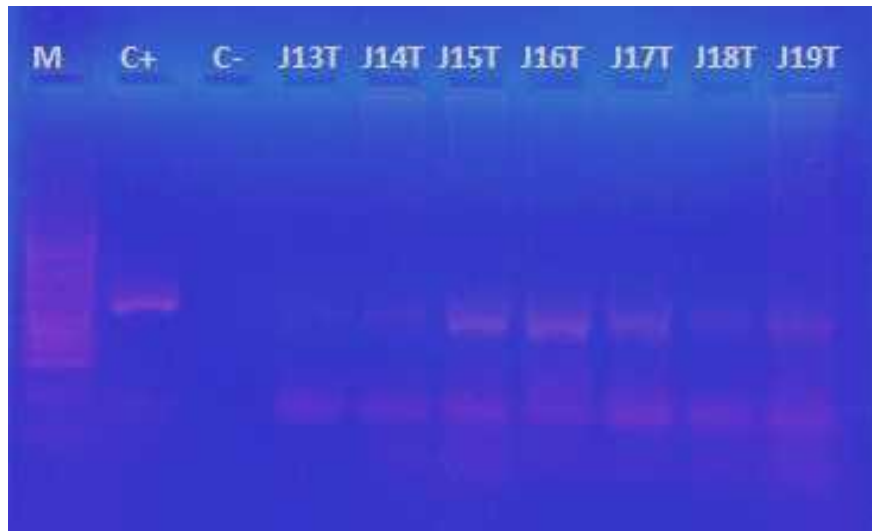
		ADN de tejido pulmonar		
		Aislamiento bacteriano		
		+	-	
PCR	+	5	14	19
	-	0	5	5
		5	19	24

Figura 16. Gel de agarosa al 3%. Muestra 6-12 de Jalisco.



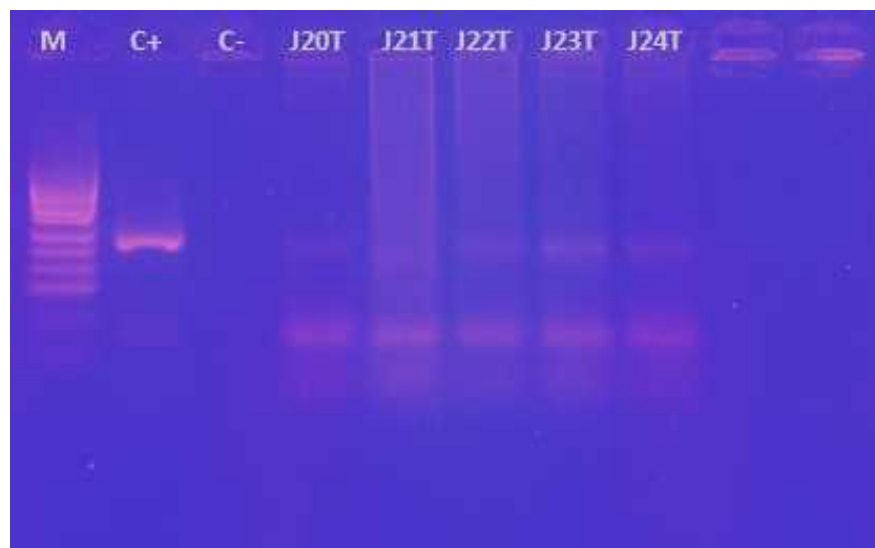
M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, J: Jalisco, T: ADN de tejido pulmonar.

Figura 17. Gel de agarosa al 3%. Muestra 13-19 de Jalisco.



M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, J: Jalisco, T: ADN de tejido pulmonar.

Figura 18. Gel de agarosa al 3%. Muestra 20-24 de Jalisco.



M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, J: Jalisco, T: ADN de tejido pulmonar.

De los 24 pulmones, el 79% fue positivo a la presencia del serotipo 13; de éstas, sólo 5 muestras fueron positivas a aislamiento bacteriano y a PCR, mientras que sólo 14 fueron positivas con PCR.

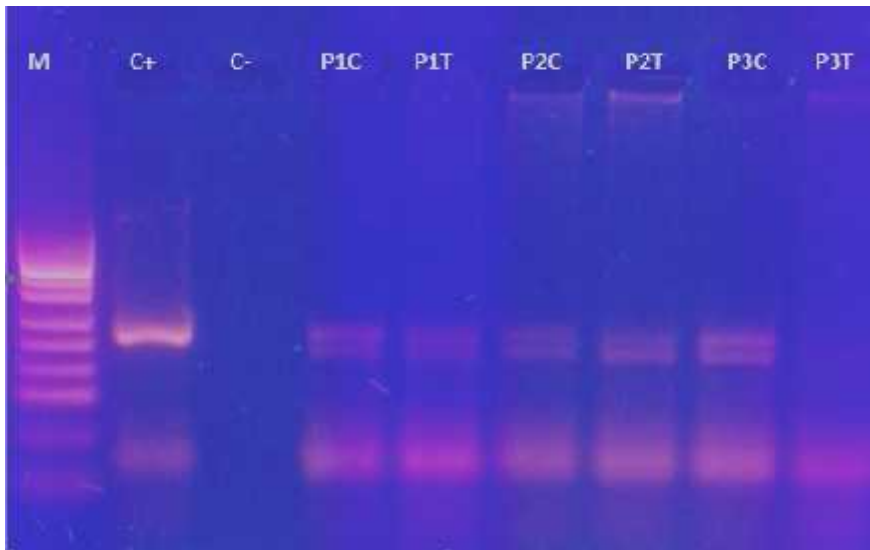
Puebla

De los 21 pulmones obtenidos, la identificación bacteriana fue posible sólo en 3 (Puebla 1-3); de éstos se realizó la extracción de DNA del cultivo bacteriano y las 3 muestras fueron positivas a PCR. Respecto a la extracción de ADN de tejido pulmonar, 2 fueron positivos a PCR (1 y 2) y 1 negativo (3), como lo muestra el Cuadro 5 y la Figura 19.

Cuadro 5. Tabla de 2x2 que presenta la frecuencia de muestras positivas y negativas para la prueba de aislamiento bacteriano y de PCR a partir de ADN de cultivo bacteriano del estado de Puebla (Puebla 1-3).

		ADN de cultivo bacteriano		
		Aislamiento bacteriano		
		+	-	
PCR	+	3	0	3
	-	0	0	0
		3	0	3

Figura 19. Gel de agarosa al 3%. Muestra 1-3 de Puebla.



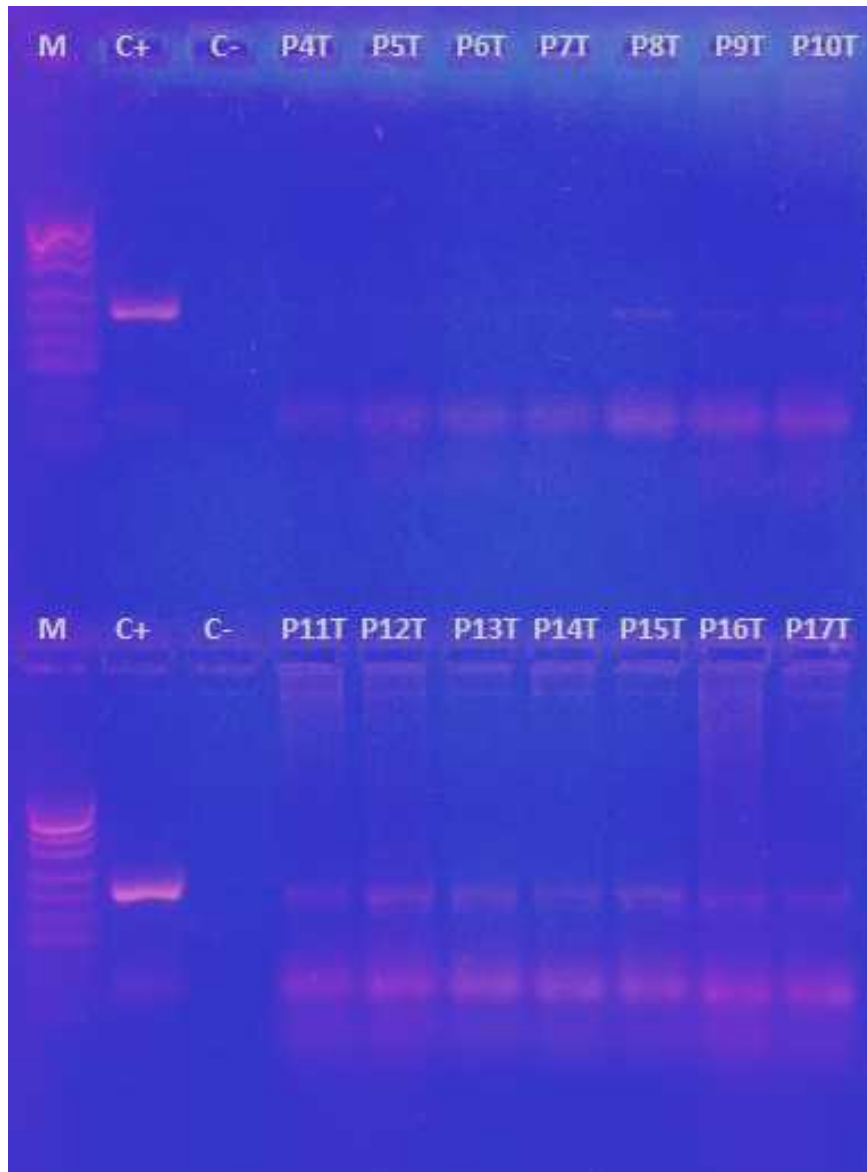
M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, P: Puebla, C: ADN de cultivo bacteriano, T: ADN de tejido pulmonar.

De los 18 pulmones negativos a identificación bacteriana (Puebla 4-18), se realizó la extracción de ADN de pulmón y 12 fueron positivos con PCR (8, 11-21); mientras que seis fueron negativos a ésta técnica (4 - 7, 9 y 10); como lo manifiesta el Cuadro 6 y las Figuras 20 y 21.

Cuadro 6. Tabla de 2x2 que presenta la frecuencia de muestras positivas y negativas para la prueba de aislamiento bacteriano y de PCR a partir del ADN de tejido pulmonar del estado de Puebla (Puebla 1-21).

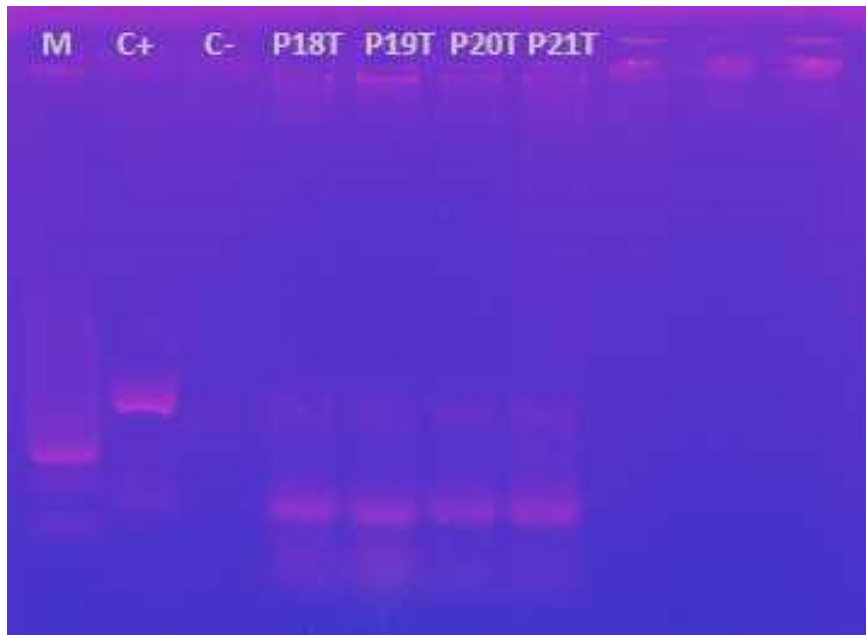
		ADN de tejido pulmonar		
		Aislamiento bacteriano		
		+	-	
PCR	+	2	12	14
	-	1	6	7
		3	18	21

Figura 20. Gel de agarosa al 3%. Muestra 4-17 de Puebla.



M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, P: Puebla, T: ADN de tejido pulmonar.

Figura 21. Gel de agarosa al 3%. Muestra 18-21 de Puebla con ADN de tejido pulmonar (T).



M: marcador de peso molecular, C+: control positivo, C-: control negativo, P: Puebla, T: ADN de tejido pulmonar.

De los 21 pulmones, el 66% fue positivo a la presencia del serotipo 13; de éstas, sólo 2 muestras fueron positivas a aislamiento bacteriano y a PCR, mientras que sólo 12 fueron positivas con PCR.

Se realizó la prueba estadística de Kappa para comparar los resultados del aislamiento bacteriano y del PCR obteniendo resultados de 0-0.20, una fuerza de concordancia de escasa a leve, esto muestra que no hay concordancia entre ambas pruebas.

Al no obtener control positivo del serotipo 14 y con la nula veracidad de la cepa de referencia, no fue posible identificar su presencia en los estados muestreados.

Discusión

La especificidad del aislamiento bacteriano es esencial para su uso en el área diagnóstica. Los resultados obtenidos del PCR son satisfactorios para la identificación del serotipo 13 como lo exponen los Cuadros 1-6, pues con el aislamiento bacteriano se excluye a otros organismos respiratorios.

En 1989 Lugo *et al.*, observaron 32 pulmones con lesiones pleuroneumónicas, caracterizadas por neumonía hemorrágica necrotizante y con el uso de criterios bioquímicos fue posible identificar solamente 5 pulmones positivos al biotipo II. En 2013 Santiago *et al.*, reportaron 1 pulmón proveniente del estado de Jalisco con neumonía fibrino hemorrágica y pleuritis difusa, empleando pruebas bioquímicas se confirmó el aislamiento e identificación del biotipo II de *App*.

Los métodos clásicos de biotipificación, ya son reemplazados por la detección de patrones moleculares encaminados a la identificación de una región del microorganismo en particular.

Las cepas clasificadas como biotipo II, que en ocasiones se reportan como *App* atípicas no pueden ser aisladas en animales portadores empleando procedimientos que han sido estandarizados para la detección de cepas típicas del biotipo I, de hecho las cepas típicas del biotipo II no presentan el patrón típico de crecimiento observado en el biotipo I. algunas cepas de los serotipos 2, 4, 7 y 9 pueden clasificarse como atípicas del biotipo II, esto se observa principalmente en Europa (Gottschalk *et al.*, 2012).

El biotipo II se encuentra principalmente en Europa, aunque en América del Norte se han aislado tres cepas (datos no publicados). En ocasiones, estas cepas no pueden ser identificadas en los portadores mediante aislamiento bacteriano, pues no hay técnicas estandarizadas para su identificación.

Muchas cepas de *App* son clonales, como consecuencia no se pueden diferenciar; pues aunque son genéticamente idénticas, no significa que son 100% la misma cepa. En 2012, Perry *et al.*, observaron que una cepa americana del serotipo 13 presentaba reacción cruzada con el serotipo 10; mientras tanto la cepa europea del serotipo 13 no

presentó este comportamiento así que se asoció a modificaciones en la acetilación en los polisacáridos capsulares.

Las dificultades en el aislamiento confieren a las técnicas moleculares cierto protagonismo como la identificación de cepas con escasa descripción, baja frecuencia de aislamiento o fenotípicamente atípicas. En el proceso de la síntesis proteica es probable que las bacterias pierdan o adquieran factores de virulencia, la alta homología genética en determinados géneros ó en un reciente cambio en la clasificación taxonómica. En 2016, Bossé *et al.*, lograron secuenciar el genoma de la cepa a-85114 y se identificó un locus diferente en la cápsula de *App*, razón por la cual se designó un nuevo serotipo, el serotipo 16; lo anterior está relacionado con discrepancias entre el fenotipo y el genotipo.

Un estudio realizado por Gottschalk (datos no publicados) demostró que animales infectados experimentalmente con el serotipo 2 de cepas francesas, manifestaron signos clínicos pocas horas post inoculación y alta mortalidad; mientras que animales infectados con cepas canadienses del mismo serotipo no presentaron ningún signo clínico. Así que este es un ejemplo de la diferencia entre dos grupos de cepas del serotipo 2; pues las cepas europeas producen las toxinas *ApxII* y *ApxIII*; mientras que las cepas de Norteamérica producen solamente *ApxII*; esto se asocia a coinfecciones por cualquier agente del síndrome respiratorio porcino.

La ausente o baja correlación entre la identificación genotípica y fenotípica sucede con genotipos idénticos o similares y diferentes fenotipos. En otras situaciones, existen especies distintas con diferencias fenotípicas pero una gran homología en las secuencias. Por el contrario, se dan circunstancias en que los microorganismos presentan secuencias con un elevado número de diferencias y sin embargo, pertenecen a la misma especie o genotipo (Bou *et al.*, 2011).

La ausencia de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas como son las 24 muestras positivas en el aislamiento bacteriano de este estudio (cuadro1-6), hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable y no definitiva; sin embargo, la alta homología genética que se presenta en

determinados serotipos como se observa en la Figura 16, son factores que pueden afectar la identificación.

Conclusiones

En este estudio se logró detectar e identificar el serotipo 13 del biotipo II de *Actinobacillus pleuropneumoniae* mediante la estandarización de la técnica de PCR a partir de la extracción de ADN de dos muestras: cultivo bacteriano y tejido pulmonar, no por esto se deben descartar los métodos tradicionales de diagnóstico sino que deben realizarse de manera conjunta.

Los oligonucleótidos diseñados para identificar el serotipo 13, generaron amplicones del tamaño esperado; aunque, considerando los resultados de la secuenciación de la muestra Jalisco 1 se hace necesario secuenciar los productos de PCR de las muestras que fueron positivas a esta prueba.

Se logró identificar la presencia de un serotipo del biotipo II en México, siendo el Estado de México y Jalisco los que presentaron un mayor número de casos positivos para el serotipo 13.

Respecto a las dos cepas de referencia es altamente probable que hayan sufrido contaminación como lo mostró la secuenciación, motivo por el cual no sirvieron como controles positivos y por lo tanto no fue posible tener una referencia para la identificación del serotipo 14.

Referencias Bibliográficas

- Angen O., Ahrens P., Jessing G. S. Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7 and 12. *Veterinary microbiology* 132 (2008): 312-318.
- Assavacheep P., Rycroft A. N. 2012. Survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outside the pig. *Research in veterinary science* 94: 22-26.
- Baltés N., Pauka I., Jacobse I., Gruber A., Gerlach G. 2003. Identification of Dimethyl sulfoxide reductase in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its role in infection and immunity. *Vol 71. N. 12* 6784-6992.
- Bandara A.B., Lawrence M.L., Veit H.P., Inzana T.J. Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. *Infect Immun* (2003)71: 3320–3328.
- Boekema B.K. , Van Putten J., Stockhofe N., Smith H.E. 2004. Host cell contact induced transcription of the type IV fimbria gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 72: 691 – 700 .
- Bossé T.J., Janson H., Sheehan J.B., Beddek J.A., Rycroft A. N., Kroll S.J., Langford R.P. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis infection. *Microbes and infection* 4 (2002) 225:235.
- Bou G.; Olmos A., García C., Nieto J., Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.* 2011:29 (8):601-608.
- Bouke K., Boekema, J., Van Putten and Hilde E. Expression of four type IV fimbrial genes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* results in intact fimbriae. (2010).
- Buettner, F. F. R., Maas, A. and Gerlach, G.-F. 2008. An *Actinobacillus pleuropneumoniae* *arcA* deletion mutant is attenuated and deficient in biofilms formation. *Vet. Microbiology.* 106-115.
- Chien S. :, Chan Y.Y., Chen W. Z., Wu M. C., Liao W.J., Chen H.T., Lee C.W., Yeh S.K., Hsuan L.S. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI

- induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Veterinary microbiology*. 135 (2009) 327-333.
- Chiers, K., Waele D.T., Pasmans F., Ducatelle R., Haesebrouck F. Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet. Res.* (2010) 41:65.
 - Debreauil J.D., Jacques M., Mittal K.R. and Gottschalk M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim health res* (2007): 2:73-93.
 - Gyles Carlton L., Prescott J., Songer G. and Thoen C. 2010. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Fourth ed. Wiley Blackwell. Chapter 19. *Actinobacillus pleuropneumoniae* 364-374. Pp. 651.
 - García C., Montañez., Tenorio V., Reyes J., Diran M., Negrete E., Guerrero a., De la Garza M. 2000. A-24kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleaves actin in vitro. *Canadian Journal of veterinary research*. 64 (2): 88-95.
 - Gottschalk Marcelo. 2012. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: todavía un patógeno de actualidad. Memorias del XLVIII Congreso Nacional AMVEC, A.C.
 - Gottschalk Marcelo. 2015. The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *The veterinary journal*. Article in press.
 - Jessing S.G., Ahrens P., Inzana T.J., and Angen O.: The genetic organization of the capsule biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 6, 7, and 12. *Vet Microbiol* (2008) 22:350-359.
 - Ito Hiroya. The genetic organization of the capsular polysaccharide biosynthesis region of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 14. *J.Vet. Med. Sci.* 77(5):583-586, 2015.
 - Izano E., Sadovskaya I., Vinogradov E., Mulks H., Velliyagounder K., Ragunath C. 2007. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Microb. Pathog.* 43:1–9.

- Kang, M., Zhou, R., Liu, I., Langford, P. R. and Chen, H. 2009. Analysis of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* multi-resistance plasmid, pHB0503. 61: 135-139.
- Liu J., Chen X., Tan C., Guo Y., Chen Y., Fu S., Bei W., Chen H. 2009. *In vivo* induced RTX toxin ApxIVA is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol*, 137:282-289.
- Maldonado J., Valls L., Martínez E., Rivera P. 2009. Isolates rates, serovars and toxin genotypes of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* among pigs sufferinf from pleuroneumonía in Spain. *J Vet Diagn Invest* 21: 854-857.
- Morilla, G.A. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. 2ª. Ed. México: El Manual Moderno, 2002.
- Negrete, E.; García, R.M.; Reyes, M.E.; Godínez, D.; de la Garza, M. 2000. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 191(1):109-113.
- Pawelek P., coulton J. 2004. Hemoglobin binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: homology modelling reveals regions of potential interacciones with hemoglobin and heme. *Journal of molecular graphics and modeling.* 23: 11-21.
- Perry M., Angen O., McLean L., Lacouture S., Kokotovic B., Gottschalk M. an atypical biotype I *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13 is present in North America. *Vet microbiology.* 156 (2012) 403-410.
- Ruiz A., Muñoz D., Quezada M. 2011. Estudios de pleuroneumonía contagiosa en Chile. *Revista Porcicultura Iberoamericana* 1:4
- Santiago L, Tapia E, Viguera R, Soto E, Sarfati D, Lozano B. Aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo II de un caso clínico. *Memorias del XLVIII Congreso Nacional AMVEC, Mazatlán, Sinaloa del 17-20 Julio 2013.*
- Serrano R.L.E., Gutierrez T.V., Suarez G.F., Cortés R.R., Mendiola R.M., Castro A.C., Vargas G.D., De la Garza M. Identification of *Actinobacillus*

pleuropneumoniae biovars 1 and 2 in pigs using a PCR assay. Molecular and cellular probes. 22 (2008) 305:312.

- Straw Barbara E., D'Alaire Sylvie Mengeling William L., Taylor David J.: Disease of swine. 10^a Ed., edit Wiley Blackwell 2012.
- Van Overbeke I. K., Chiers G., Charlier I., Vandenberghe J., Van Beeumen, Ducatelle R. 2002. Characterization of the *in vitro* adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. Vet. Microbiol. 88: 59 – 74 .
- Verdugo D., Godínez V., Serrano L., Garza R., Guerrero B. Adhesion de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a componentes de matriz extracelular de cerdo. Ciencia veterinaria 9 -2003-4- 269-264.
- Xiao Guo-sheng, Cao San-jie, Duan Li-li, Wen Xin-tian, Ma Xiao-ping and Chen Hua-mei. Identification and Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Infected and Subclinically Infected Pigs by Multiplex PCR Based on the Genes ApxIVA and OmlA. Agricultural sciences in China. 2006, 5(2): 146-154
- Xu, Z., Zhou, Y., Li, L., Zhou, R., Xiao, S., Wan, Y., Zhang, S., Wang, K., Li, W., Li, L., Jin, H., Kang, M., Dalai, B., Li, T., Liu, L., Cheng, Y., Zhang, L., Xu, T., Zheng, H., Pu, S., Wang, B., Gu, W., Zhang, X., Zhu, G-F., Wang, S., Zhao, G-P. and Chen, H. 2008. Genome biology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03, an isolate of serotype 3 prevalent in China. PLoS ONE. 3(1):e1450. doi:10.1371/journal.pone.0001450.

