



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estudio de la presencia del *Actinobacillus pleuropneumoniae* en muestras biológicas del cerdo mediante PCR.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

GUSTAVO ADOLFO ROSALES SOTO

**ASESOR: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA.
COASESOR: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO.
COASESOR: M.C. ARIANNA ROMERO FLORES.**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE.

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio de la presencia del Actinobacillus Pleuropneumoniae en muestras biológicas del cerdo mediante PCR.

Que presenta el pasante: Gustavo Adolfo Rosales Soto

Con número de cuenta: 309278942 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de Junio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Eliss Mendoza Ilvira	
VOCAL	Dr. Victor Manuel Zendejas Buitrón	
SECRETARIO	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
2do. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 12/1)

LMCE/oga*

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Virología y Microbiología de las Enfermedades del Cerdo, Edificio de Posgrado, Campo 1, bajo la dirección de la Dra. Susana Mendoza Elvira y con el apoyo de los Proyectos: PAPIIT IN228516 y del PIAPI1827.

Agradecimientos

Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda, y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta que los pones en frente mío para que mejore como ser humano y crezca de diversas maneras. Este trabajo de tesis ha sido una gran bendición en todo sentido y te lo agradezco padre, y no cesan mis ganas de decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida. Gracias por estar presente no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mi persona.

A través de mi acelerada vida, en ocasiones es difícil demostrar el afecto y/o agradecimiento a las personas más importantes en mi vida. Esta tesis se la dedico a mi familia quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Le doy gracias a mis padres Gustavo y Yolanda por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida, por ser los mejores, por haber estado conmigo apoyándose en los momentos más difíciles, por dedicar tiempo y esfuerzo para moldear mi persona y formar en mí un hombre de bien, darme excelentes consejos en mi caminar diario y, sobre todo, por ser un excelente ejemplo de vida a seguir, por preocuparse por mí en cada momento, sea tarde o temprano, sea de día y de noche. Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. "Enseñarás a volar, pero no volarán tu vuelo. Enseñarás a soñar, pero no soñarán tu sueño. Enseñarás a vivir, pero no vivirán tu vida. Sin embargo... en cada vuelo, en cada vida, en cada sueño, perdurará siempre la huella del camino enseñado" [Madre Teresa De Calcuta].

El desarrollo de esta tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo hacer, es afirmar que durante todo este tiempo pude disfrutar de cada momento, que cada investigación, proceso, y proyectos que se realizaron dentro de esta, lo disfruté mucho, y no fue porque simplemente me dispuse a que así fuera, fue porque mis amigos y tutores siempre estuvieron ahí, fue porque la vida misma me demostró que de las cosas y actos que yo realicé, serán los mismos que harán conmigo; por eso, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi tutora a la Dra. Susana E. Mendoza Elvira, por su infinita paciencia y por compartir conmigo sus valiosos conocimientos y vivencias, por ser la voz de la sabiduría, por haberme alentado en los momentos más difíciles y en momentos en los que estuve a punto de claudicar, lo que me permitió llegar a esta etapa; sin sus consejos hubiera sido imposible concluir de manera exitosa este trabajo, gracias por todo maestra (como yo siempre le digo); es en la escuela otra madre que orienta con sus consejos; es experta sembradora de nobles conocimientos; es mano suave que guía y es luz que alumbra senderos. Es, en suma, la



maestra, manajo cálido y tierno de bondadosa paciencia y de maternal afecto; a la M.C. Arianna Romero Flores por su también infinita paciencia y por compartir conmigo sus conocimientos, lo que a la vez nos permitió obtener valiosas experiencias, así como sus consejos para la realización de éste trabajo, y a todos mis compañeros y profesores de posgrado, con todos ustedes aprendí muchas cosas y siempre demostrándome lo mejor de cada uno de ustedes, lo mejor de las personas.

En agradecimiento al Doctor Luis Felipe Islas Guerrero, director operativo de pecuarios.com, por el donativo del Wizard Genomic DNA Purification kit.

Agradezco de todo corazón las enseñanzas brindadas por todos y cada uno de mis maestros a lo largo de la carrera y de la vida académica en general, de todos me llevo algo muy especial y sé que lo aprendido jamás se olvida; este esfuerzo de superación y trabajo es para ustedes, se los dedico de una manera muy especial a todos ustedes profesores quienes en todo momento estuvieron para ayudar y nunca dijeron que no, por más cansados, fatigados y atareados que llegaron a estar y que (espero) siempre estén ocupados y con mucho trabajo, porque en el trabajo, es mejor que sobre a que falte. Porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron ahí para mostrarme el mejor camino, impulsándome en los momentos más difíciles, y no sólo de la carrera.

Podemos ayudar y guiar a muchas personas si ellas lo permiten, pero también podemos ser ayudados y guiados durante nuestra vida; quiero exaltar la labor de todos mis amigos, todos aquellos que estuvieron presentes durante toda o la mayor parte de la vida universitaria y de la formación académica en general; y también, gracias a aquellos que con respeto y decencia realizaron aportes a esta tesis, en la realización y el desarrollo de la misma. Por todos los que estuvieron en alguna etapa de mi vida (amigos, colegas, compañeros), que nunca dejaron de creer en mí; por ustedes, por lo que valen, por haberme apoyado en cada una de mis etapas en la facultad (y de la vida en general), y por haberme motivado a siempre seguir adelante, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí; nombrarlos a todos, y todas las experiencias que vivimos sería una labor de muchas hojas, tantas o más como las que son de este escrito, por lo que trato de resumirlo en algunas palabras, ustedes saben que siempre estarán conmigo, gracias a todos. Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles. “Amigos, compañeros y colegas, gracias por estar a mi lado haciendo que mis problemas se vuelvan más pequeños y mis alegrías más grandes. Definitivamente el haberlos conocido es lo mejor que me ha podido pasar.” Como diría un antiguo proverbio: “Siembra una buena y sincera amistad, y muy probablemente el tiempo te permitirá disfrutar de una agradable cosecha”.



“No es necesario escribir frases de Neruda ni versos de Bécquer, solo tienes que ver mi corazón, que se muere por verte”. A María Fernanda, le agradezco por tantas ayudas y tantos aportes no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida; eres mi inspiración y mi motivación, por ser una parte muy importante de mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, sobre todo por aquella paciencia y amor incondicional; “nunca temo por nada, pero a ti que tanto te amo, tiemblo con cada mirada”. Fuiste el ingrediente perfecto para poder lograr alcanzar esta dichosa y muy merecida victoria en la vida, el poder haber culminado esta tesis con éxito, y poder disfrutar del privilegio de ser agradecido, ser grato con esa persona, tú que te preocupaste por mí si ya era tarde para que no me pasara nada malo en la calle, para que llegara siempre con bien a la casa, así sea tarde o sea temprano, así sea de día o sea de noche; no olvides ese día, no olvides ese momento, desde nuestro primer beso, en mi corazón te llevo dentro, tu que quisiste siempre lo mejor para mi porvenir. Me ayudaste hasta donde te era posible, incluso más que eso; la ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante. Tus manos son mi caricia, mis acordes cotidianos, te quiero porque tus manos trabajan por la justicia. Si te quiero es porque sos mi amor, mi cómplice y todo y en la calle, codo a codo, somos mucho más que dos. Tus ojos son mi conjuro contra la mala jornada, te quiero por tu mirada que mira y siembra futuro. Tu boca que es tuya y mía, tu boca no se equivoca, te quiero porque tu boca sabe gritar rebeldía. Si te quiero es porque sos mi amor, mi cómplice y todo y en la calle, codo a codo somos mucho más que dos. Y por tu rostro sincero y tu paso vagabundo y tu llanto por el mundo, porque sos pueblo te quiero. Y porque amor no es aureola, ni cándida moraleja y porque somos pareja que sabe que no está sola. Te quiero en mi paraíso, es decir que en mi país la gente viva feliz, aunque no tenga permiso. Si te quiero es porque sos mi amor, mi cómplice y todo y en la calle, codo a codo, somos mucho más que dos [Benedetti, M].

Buena parte de la planta profesional del país se formó en la UNAM. Sus institutos de investigación científica y humanística cubren diversas ramas del árbol del conocimiento y sus investigadores alcanzan, en no pocos casos, un reconocimiento internacional. Varios de sus maestros históricos y actuales son un ejemplo de entrega. Su labor de difusión ha sido variada y admirable. La UNAM merece con creces el agradecimiento de la nación. Personal y familiarmente, también yo soy deudor suyo. En efecto, son muchos y muy complejos los retos que hoy nos tocan afrontar. Pero encontramos en nuestros maestros, que nos enseñaron a pensar en libertad; en nuestros colegas, con quienes reflexionamos cotidianamente con rigor intelectual, y en nuestros estudiantes, cuyo cuestionamiento continuo constituye un estímulo vital insustituible, los elementos necesarios para afrontar tales retos con un optimismo cauteloso, pero bien fundado, con espíritu crítico y con la inteligencia que la naturaleza nos permite. En el mundo cada vez más interdependiente en el que estamos inmersos, la Universidad, como institución emblemática de la educación superior, de la investigación científica, de la creación artística y de la difusión de la cultura, se sitúa nuevamente en el epicentro de la atención social, del debate intelectual, de las



preocupaciones políticas y económicas de nuestro tiempo; pero sobre todo, la Universidad se reafirma como la gran esperanza para miles de jóvenes que siguen viendo en ella la única o la mejor de sus posibilidades para acceder a una vida más digna, más productiva, más decorosa. Porque la Universidad también es eso: una defensora indeclinable de los principios de libertad, solidaridad y justicia. A la Universidad Nacional Autónoma de México la cual llevo en el corazón, siempre, que me dio todo y abrió sus puertas del conocimiento para mí. A mi maravillosa Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, nido de muchos que, como yo, eligieron esta extraordinaria carrera y que con mucho orgullo, amor, pasión y respeto representaré. A la universidad, que me dio la bienvenida al mundo como tal, las oportunidades que me ha brindado son incomparables, y antes de todo esto ni pensaba que fuera posible algún día que me topara con una de ellas. En la Universidad, el respeto a las diferencias ideológicas es un valor fundamental. Disentir es un privilegio de la razón y de la inteligencia, hacerlo con violencia e intolerancia es inaceptable en una casa donde se cultiva el saber. De ahí que lo que se discute hoy en día no es ya la importancia de la Universidad. Tampoco bastan las formulaciones genéricas. Procede, acaso, profundizar en el diseño sobre el cual se construyan la Universidad del futuro y el futuro de la Universidad. Agradezco mucho por la ayuda de mis maestros, mis compañeros, y a toda la universidad en general, por todo lo anterior en conjunto con todos los copiosos conocimientos que me ha otorgado.

Cien años de la universidad: *“Los conspicuos adoradores de la fuerza transmutada en derecho, el autor del Imperio germánico y el autor de la Vida estrenua; el que la concebía como instrumento de dominación, como el agente superior de lo que Nietzsche llama la voluntad de potencia, y el que la preconiza como agente de civilización, esto es, de justicia son quienes principalmente han logrado imbuir en el espíritu de todos los pueblos capaces de mirar lo porvenir, el anhelo profundo y el propósito tenaz de transformar todas sus actividades: la mental, como se transforma la luz, la sentimental, como se transforma el calor, y la física, como se transforma el movimiento, en una energía sola, en una especie de electricidad moral que es propiamente la que integra al hombre, la que lo constituye en su valor, la que lo hace entrar como molécula consistente en distintas evoluciones que determinan el sentido de la evolución humana, en torrente del perenne de venir... Esta resolución de ser fuertes, que la antigüedad tradujo por resultados magníficos en grupos selectos y que entra ya en el terreno de las vastas realizaciones por nacionalidades enteras, muestra que el fondo de todo problema, ya social, ya político, tomando estos vocablos en sus más comprensivas acepciones, implica necesariamente un problema pedagógico, un problema de educación. Porque ser fuertes, ya lo enunciamos, es para los individuos resumir su desenvolvimiento integral, físico, intelectual, ético y estético en la determinación de un carácter. Claro que el elemento esencial de un carácter está en la voluntad; hacerla evolucionar intensamente, por medio del cultivo físico, intelectual, moral, del niño al hombre, es el soberano papel de la escuela primaria, de la escuela por antonomasia; el carácter está formado cuando se ha impreso en la voluntad ese magnetismo misterioso,*



análogo al que llama a la brújula hacia el polo, el magnetismo del bien. Cultivar voluntades para cosechar egoísmos sería la bancarrota de la pedagogía; precisa imantar de amor a los caracteres; precisa saturar al hombre de espíritu de sacrificio para hacerle sentir el valor inmenso de la vida social, para convertirlo en un ser moral en toda la belleza serena de la expresión; navegar siempre en el derrotero de ese ideal, irlo realizando día a día, minuto a minuto: he aquí divina misión del maestro. La Universidad, me diréis, no puede ser una educadora en el sentido integral de la palabra; la Universidad es una simple productora de ciencia, es una intelectualizadora; sólo sirve para formar cerebrales. Y sería, podría añadirse entonces, sería una desgracia que los grupos mexicanos ya iniciados en la cultura humana, escalonándose en gigantesca pirámide, con la ambición de poder contemplar mejor los astros y poder ser contemplados por un pueblo entero, como hicieron nuestros padres toltecas, rematase en la creación de un adoratorio en torno del cual se formase una casta de la ciencia, cada vez más alejada de su función terrestre, cada vez más alejada del suelo que la sustenta, cada vez más indiferente a las pulsaciones de la realidad social turbia, heterogénea, consciente apenas, de donde toma su savia y en cuya cima más alta se enciende su mentalidad como una lámpara irradiando en la soledad del espacio... [Sierra, J]

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.



Gracias.



Índice General

SUBCONTENIDO	CONTENIDO	PAGINAS
	Agradecimientos	iv
	Índice general	ix
	Índice de cuadros	xi
	Índice de figuras	xii
	Abreviaturas y siglas usadas.	xiv
	Resumen	xv
1	Introducción	1
2	Antecedentes	2
2.1	La porcicultura en México	2
3	Enfermedades respiratorias del cerdo	9
4	Enfermedades de origen bacteriano	9
5	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (App).	10
5.1	Antecedentes	10
5.2	Características	11
5.3	Cultivo	11
5.4	Adhesión	13
5.5	Serotipos	14
5.6	Epidemiología, resistencia en el ambiente y a factores físico-químicos	15
5.7	Factores de virulencia y patogenia	16
5.8	Inmunidad	22
5.9	Lesiones	23
5.10	Signos clínicos	24
5.11	Patología macroscópica, lesiones	26
5.12	Patología microscópica, lesiones	27
5.13	Diagnóstico de laboratorio	28
6	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
6.1	Proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	34
6.2	Etapas básicas en la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final	37
6.3	Ventajas y desventajas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
7	Objetivos	44
7.1	Objetivo general o principal	44
7.2	Objetivos secundarios	44
8	Materiales y métodos	44
8.1	Lugar donde se trabajaron las muestras	44
8.2	Raza de los animales	44
8.3	Muestreo y tamaño de la muestra	45
8.4	Características de las granjas porcícolas	45
8.5	Cerdos del estudio	45



8.6	Obtención y preservación de las muestras de tejido	46
8.7	Técnica de PCR	46
8.8	Aislamiento e Identificación de las bacterias como control positivo	46
8.9	Preparación de biomasa	47
8.10	Extracción de DNA para tejidos	47
8.11	Estandarización de los “primers”, preparación de la PCR de punto final y amplificación	48
9	Resultados	50
10	Discusión (Análisis de resultados)	58
11	Conclusiones	66
12	Referencias (Literatura Citada)	68



Índice de cuadros

Cuadro	Contenido	Número de página
1	Información a nivel nacional y por entidad federativa sobre la producción de carne en canal para consumo humano de cuatro especies ganaderas: bovino, porcino, ovino y caprino.	5
2	Determinaciones principales y diferenciación metabólica entre <i>A. pleuropneumoniae</i> y especies próximas	12
3	Toxinas producidas por distintas cepas de <i>App</i>	20
4	Ventajas y desventajas de la PCR	40
5	Secuencia de los primers utilizados en la PCR para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	49
6	Pruebas de identificación	52
7	Total de muestras analizadas	57
8	Patrones observados de la PCR para los genes <i>apx /omlA</i> de las cepas del biotipo 1 de <i>A. pleuropneumoniae</i> de pulmones y amígdalas	62



Índice de figuras

Figura	Contenido	Número de página
1	Consumo per cápita de carne por país y región	3
2	Crecimiento de la producción de carne por región y tipo de carne	4
3	Gráfica de cifras preliminares a partir del 2017/01	6
4	Gráfica de volumen de la producción de la carne en canal de ganado	7
5	Gráfica de valor de la producción de la carne en canal de ganado	8
6	Las adhesinas fimbriales	14
7	Esquema de una estructura bacteriana	17
8	Desnaturalización del DNA	37
9	Alineamiento del DNA	38
10	Extensión del DNA	39
11	Equipo de diagnóstico	48
12	Pulmón con lesión crónica	50
13	Pulmón con lesión crónica después de la esterilización	50
14	Bacteria identificada en microscopio	51
15	Placa de Petri Agar BHI	51
16	Placa de Petri Agar PPLO+NAD	51
17	Prueba para el serotipo	52
18	Prueba con el control positivo y muestra de tonsila	52
19	Electroforesis de pulmón	53
20	Electroforesis de macerado de pulmón	54



21	Secuencia de los “primers” utilizados para la identificación del serotipo 3	55
22	Secuencia de los “primers” utilizados para la identificación del serotipo 1	56
23	Secuencia de los “primers” utilizados para la identificación del serotipo 5b	56



Abreviaturas y siglas usadas

<i>App</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
CAMP	Adenosín monofosfato cíclico (AMPc, cAMP, AMP cíclico o adenosín monofosfato-3',5' cíclico)
CRP	Complejo Respiratorio Porcino
DGIAAP	Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE.UU.	Estados Unidos
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisacárido
MEC	Matriz Extra Celular
NAD	Nicotin Adenin Dinucleótido
PCR	Reacción en Cadena de la polimerasa
PME	Proteínas de Membrana Externa
PPLO	Pleuropneumonia-like organisms (Agar)
PP	Pleuroneumonía Porcina
RNA	Ácido Ribonucleico
SENASICA	Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
T _m	Temperatura de fusión
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa



Resumen

En los sistemas de producción del ganado porcino se encuentran agentes patógenos que afectan directamente a los parámetros productivos, estos agentes tienen un impacto económico debido a su actividad virulenta dentro del animal. Dentro de estas afecciones se encuentran las enfermedades del complejo respiratorio que han sido identificadas como el principal síndrome que ocasiona mermas a la producción de ganado porcino en explotaciones comerciales. Éste complejo se encuentra asociado con varios agentes etiológicos presentándose constantemente en las granjas. La pleuroneumonía porcina es una de las enfermedades respiratorias más importantes en la industria porcícola, la cual, presenta un cuadro agudo, hiperagudo y crónico en cerdos, que suelen morir debido a una neumonía hemorrágica necrótica; sin embargo, el impacto económico de la enfermedad se centra más en la disminución de la tasa de crecimiento de los cerdos enfermos crónicos. La pleuroneumonía porcina (PP) es un proceso respiratorio de carácter infeccioso, agudo o crónico, caracterizado por bronconeumonía necrótica hemorrágica y pleuritis fibrinosa, producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*).

En el presente trabajo se realizó el aislamiento de *App* a partir de muestras de tejido provenientes de cerdos de una edad no mayor a dos años de vida, como son: pulmón, corazón y tonsilas. Estas muestras son provenientes de granjas comerciales de la zona del bajo; se determinó la presencia de la bacteria por medio de la estandarización de “primers” específicos para los serotipos 1, 3 y 5 y posteriormente mediante la metodología de la Reacción en cadena de la Polimerasa. En los resultados obtenidos se observó que *App* está presente en un 20% de las muestras analizadas; en la electroforesis, los resultados obtenidos fueron los esperados, se obtuvo un resultado de 417-418pb, por lo que el número de pares de bases obtenido fue el esperado, como lo mencionan los estudios realizados por Janine T. Bossé; *et al*, 2014; L. Zhou; *et al*, 2011. La virulencia/infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* está influenciada por polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos, proteínas de membrana, factores de adhesión y exotoxinas. De este modo, los sistemas de tipificación molecular para identificar este tipo de bacterias, se basan en los genes *apx* y *omlA* [Gram T; *et al*, 2000 y Rayamajhi N; *et al*, 2005]; se afirmó que los “primers” utilizados para la identificación de *App* son los adecuados. Aunque es posible que existan otras bacterias contaminando a los cerdos (ya que *App* no es la única bacteria perteneciente al CRP), se sugiere que los cerdos actúan como portadores sanos; por lo tanto, el problema respiratorio causado por *A. pleuropneumoniae* es considerado un problema endémico.



1. Introducción

En la actualidad los mercados nacionales e internacionales demandan que los alimentos de origen cárnico no causen daño a la salud, ya que existen sustancias que en forma accidental o inducida pueden contaminarlos. Por lo anterior, es imprescindible establecer políticas y acciones que promuevan la inocuidad de los alimentos y que garanticen su calidad higiénica para beneficio de los consumidores. Una de las acciones que tiene el Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), es lograr que la producción de carne en granjas porcícolas sea segura para el consumo; es por esto que el SENASICA a través de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP), ha diseñado un Programa Voluntario para implementar las Buenas Prácticas de Producción en Granjas Porcícolas [Manual de Buenas Prácticas de Producción en Granjas Porcícolas, 2004]. La carne roja de mayor consumo mundial es la carne de cerdo, cuya demanda en las últimas décadas ha experimentado un fuerte incremento. Ello se ha debido a los cambios en los patrones de consumo derivados del aumento de ingresos en los países en desarrollo con economías de rápido crecimiento. Junto con el de las aves de corral, el porcino es el subsector pecuario de mayor crecimiento, con un número de animales que alcanzará los mil millones antes de 2015, el doble que en la década de 1970. La producción porcina está distribuida por todo el mundo, con exclusión de algunas regiones que mantienen ciertas reservas culturales y religiosas en relación con el consumo de carne de cerdo [Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2017]. En la figura 1 y 2, se muestran distintos gráficos donde se observan el consumo y producción de carne de cerdo a nivel mundial [OCDE/FAO, 2017].

Dada la importancia de las enfermedades respiratorias que afectan al cerdo, se han implementado varias pruebas de diagnóstico, dentro de las cuales, se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) que consiste en amplificar rápidamente el DNA, además de ser una técnica muy sensible y específica, ofreciendo ventajas sobre técnicas de diagnóstico tradicionales [Torremorell, M., *et al.*, 1997]. Por consiguiente, el presente proyecto propone determinar la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*) en muestras patógenas de cerdo de una edad no mayor a dos años de vida, de distintos órganos, como son pulmones, tonsilas y corazón; provenientes de distintas granjas de la República Mexicana (específicamente del bajío), utilizando técnicas de biología molecular para detectar a la bacteria con mayor sensibilidad y especificidad [Altcheh, J., *et al*, 2005], ya que, hasta la fecha, no existe un estudio formal. Teniendo en cuenta lo anterior, el propósito del presente trabajo es detectar la presencia de *App*, con ello, nos interesa no subestimar otros patógenos presentes en las granjas porcícolas por lo que elegimos el diagnóstico molecular por PCR.



2. Antecedentes

2.1 La porcicultura en México

El consumo de carne de cerdo (*Sus scrofa* doméstica) ocupa el tercer lugar a nivel nacional, representa la actividad productiva con mayor captación de la producción de granos forrajeros. El cerdo moderno tuvo su origen del cruce del cerdo de Europa y el cerdo del Sureste de Asia; el primero era un animal muy rústico que tenía un desarrollo muy lento y maduraba tarde, el otro era un animal pequeño con patas cortas, que crecía rápidamente y maduraba temprano. Estos animales fueron domesticados hace unos 6000 años. Los primeros cerdos llegaron a América con los conquistadores, estos animales se multiplicaron rápidamente en México y Brasil, pero en el resto de Latinoamérica no son muy numerosos [MANUAL DEL PARTICIPANTE PRODUCCIÓN DE CERDOS, 2005]. El Consumo per cápita de carne por país y región de diferentes animales a nivel mundial (entre ellos el cerdo), así como un estimado para el año 2026, se observa en la figura 1, mientras que en la figura 2 se observa el crecimiento de la producción de carne por región y tipo de carne en países desarrollados y subdesarrollados [OCDE/FAO, 2017]. Los factores que han determinado la escasa población de cerdos en Latinoamérica son la competencia del cerdo con el hombre por los granos, la existencia de extensos pastizales naturales adecuados para la explotación de bovino, y la dificultad para conservar la carne de cerdo. Sin embargo, a través de los tiempos, el cerdo ha ido transformándose de un animal muy rústico en un animal sumamente eficiente para transformar (cruza). [MANUAL DEL PARTICIPANTE PRODUCCIÓN DE CERDOS, 2005].

La porcicultura en México es una de las principales actividades económicas del sub-sector pecuario. El consumo de carne de cerdo ocupa el tercer lugar a nivel nacional. Jalisco encabeza la producción nacional en este sector con una cifra productiva de 306 mil 148 toneladas, le sigue Sonora con 254 mil 660 T., Puebla con 165 mil 563 T., Yucatán con 138 mil 917 T. y finalmente Veracruz con 129 mil 665 T.; entre estos cinco estados, el aporte a la producción de 2017 fue de poco más del 69% del total. A nivel nacional la producción de carne de cerdo tuvo un crecimiento del 4.6% llegando el año 2016 a 1 millón 439 mil 933 Toneladas. Hasta ahora existen en México 16.7 millones de cabezas en población y 850 mil vientres en producción; en 2017 se exportaron poco más de 124 mil toneladas de carne, la variación respecto a 2016 fue de 16.5% al alza [Hernández, C. R., *et al*, 2002; Porcicultura.com, 2018].

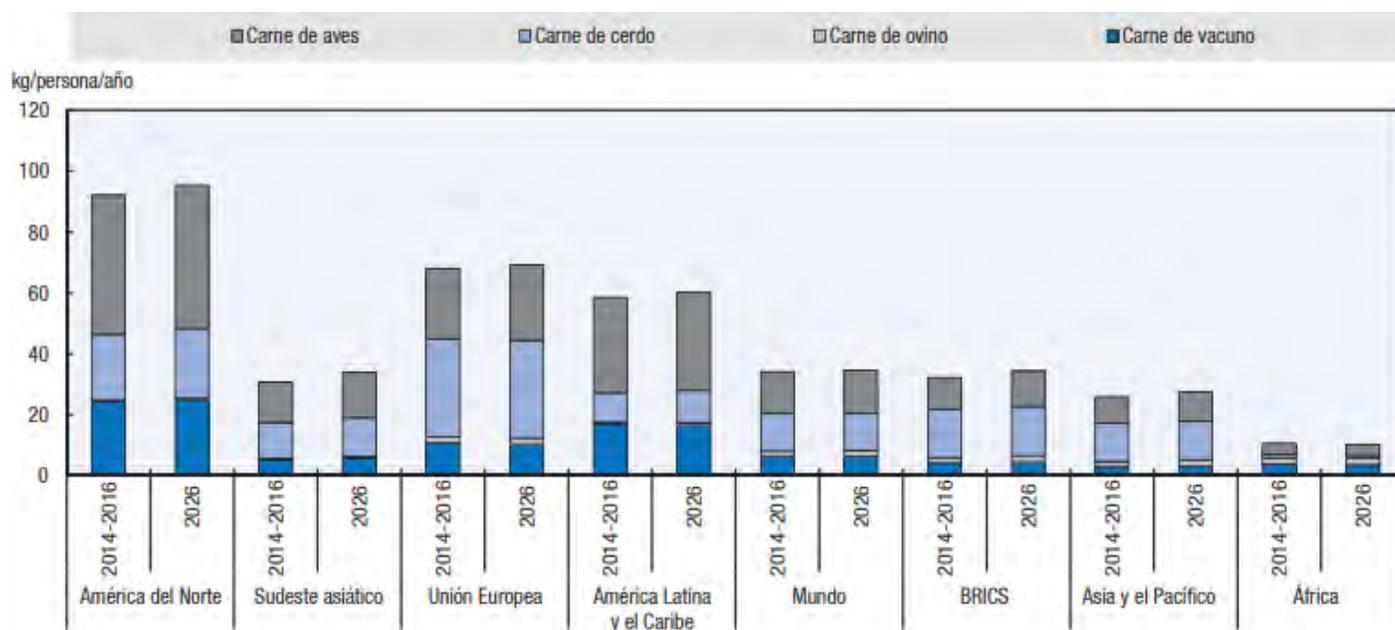
EN 2018 YA EMPIEZAN LAS CIFRAS DE CRECIMIENTO

En enero de este año el sector porcícola ya comenzó con las cifras positivas, registró un incremento en la producción del 3.4% de 2017, pasando de 115 mil 228 toneladas a 119 mil 191. La producción de carne de cerdo, res, pollo, pavo y huevo para plato registró durante el año pasado un comportamiento positivo; estados como Yucatán y San Luis Potosí ganaron



terreno. Durante 2017 la producción de carne de cerdo registró un crecimiento de 4.6%, esto en comparación con el año anterior; **el aumento generalizado de estos tipos de proteína animal en comparación con 2016** fue de 3.7%; los estados de Jalisco y Veracruz fueron los de mayor aportación en esos sectores [Porcicultura.com, 2018]. En el cuadro número 1 se muestra la información a nivel nacional y por entidad federativa sobre la producción de carne en canal para consumo humano de cuatro especies ganaderas, como son: bovino, porcino, ovino y caprino en la República Mexicana, en la gráfica número 1 se muestran las cifras preliminares a partir de 2015/01 hasta 2017/11 en unidades de Toneladas, en la gráfica número 2, se muestra el volumen de la producción de la carne en canal de ganado partir de 2015/01 hasta 2017/12 en unidades de Toneladas y en la gráfica número 3, se observa el valor del volumen de la producción de la carne en canal de ganado y de las diferentes carnes que se consuman en el país, de igual forma, partir de 2015/01 hasta 2017/12 en una ganancia de miles de pesos [Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018].

Figura 1. Consumo per cápita de carne por país y región [OCDE/FAO (2017)].



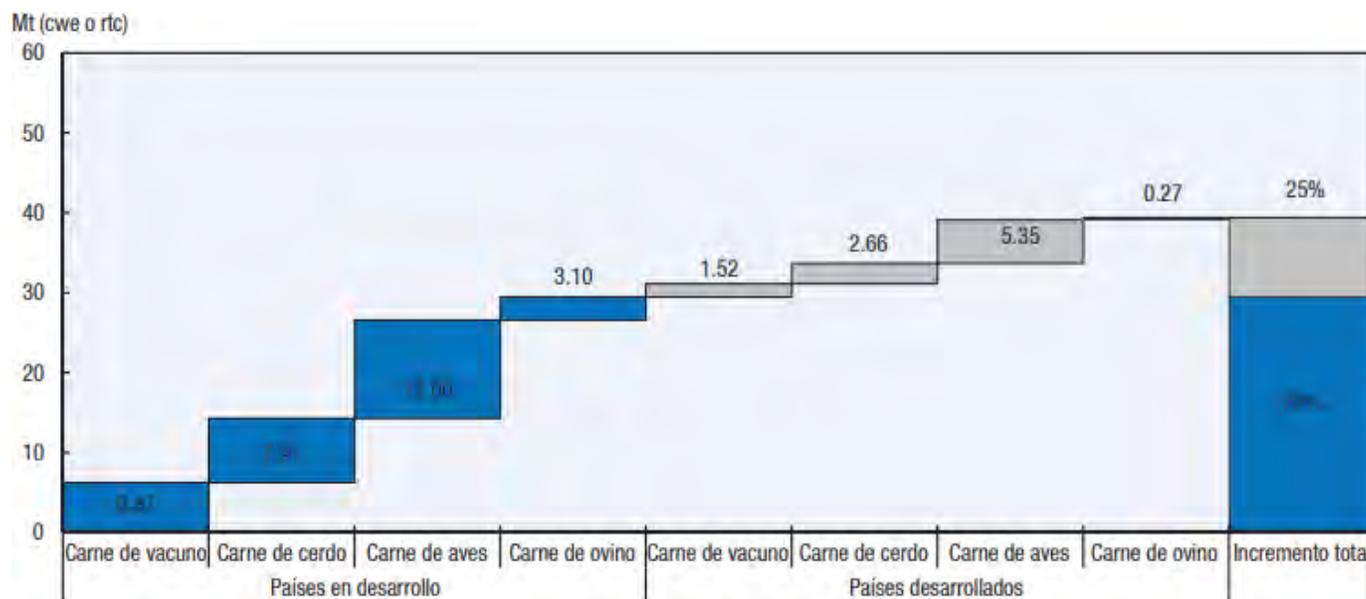
Nota: cwe es el equivalente de peso en canal; rtc es el equivalente de listo para cocinarse.

Consultados el día 16 de enero de 2018

Como se muestra en la figura número 1, en los países desarrollados en los que el nivel de consumo es ya alto, la demanda de carne seguirá en aumento, en particular en Estados Unidos, aunque a tasas generalmente menores que las de los países en desarrollo, donde el crecimiento de la población suele ser mayor



Figura 2. Crecimiento de la producción de carne por región y tipo de carne [OCDE/FAO (2017)].



Nota: cwe es el equivalente de peso en canal; rtc es el equivalente de listo para cocinarse.

Consultados el día 16 de enero de 2018

En la figura número 2, se puede observar el crecimiento de la producción de carne por región y tipo de carne, por lo que se puede hacer una proyección a que la producción total de carne aumentará ligeramente alrededor de 39 Mt para 2026 hasta alcanzar casi 353 Mt. Esta evolución sucederá sobre todo en los países en desarrollo, que representan más o menos 75% de la producción adicional. A partir de 2016, se prevé que la producción de carne de aves de corral superará a la de carne de cerdo.



Cuadro 1. Información a nivel nacional y por entidad federativa sobre la producción de carne en canal para consumo humano de cuatro especies ganaderas: bovino, porcino, ovino y caprino [Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018].

Variable	Dic 2016	Dic 2017	Variación/ Dic 2017
Ganado Bovino			
Número de cabezas	152 647	157 674	3.3
Volumen de la producción (Toneladas)	40 254	41 143	2.2
Valor de la producción (Miles de pesos)	2 150 196	2 249 260	4.6
Ganado Porcino			
Número de cabezas	497 614	495 313	-0.5
Volumen de la producción (Toneladas)	36 083	36 111	0.1
Valor de la producción (Miles de pesos)	1 479 643	1 516 269	2.5
Ganado Ovino			
Número de cabezas	12 707	13 508	6.3
Volumen de la producción (Toneladas)	287	319	11.1
Valor de la producción (Miles de pesos)	14 239	16 343	14.8
Ganado Caprino			
Número de cabezas	7 315	5 866	-19.8
Volumen de la producción (Toneladas)	126	110	-12.7
Valor de la producción (Miles de pesos)	6 253	5 563	-11.0

¶ Cifras preliminares a partir de 2017/01

Fuente:

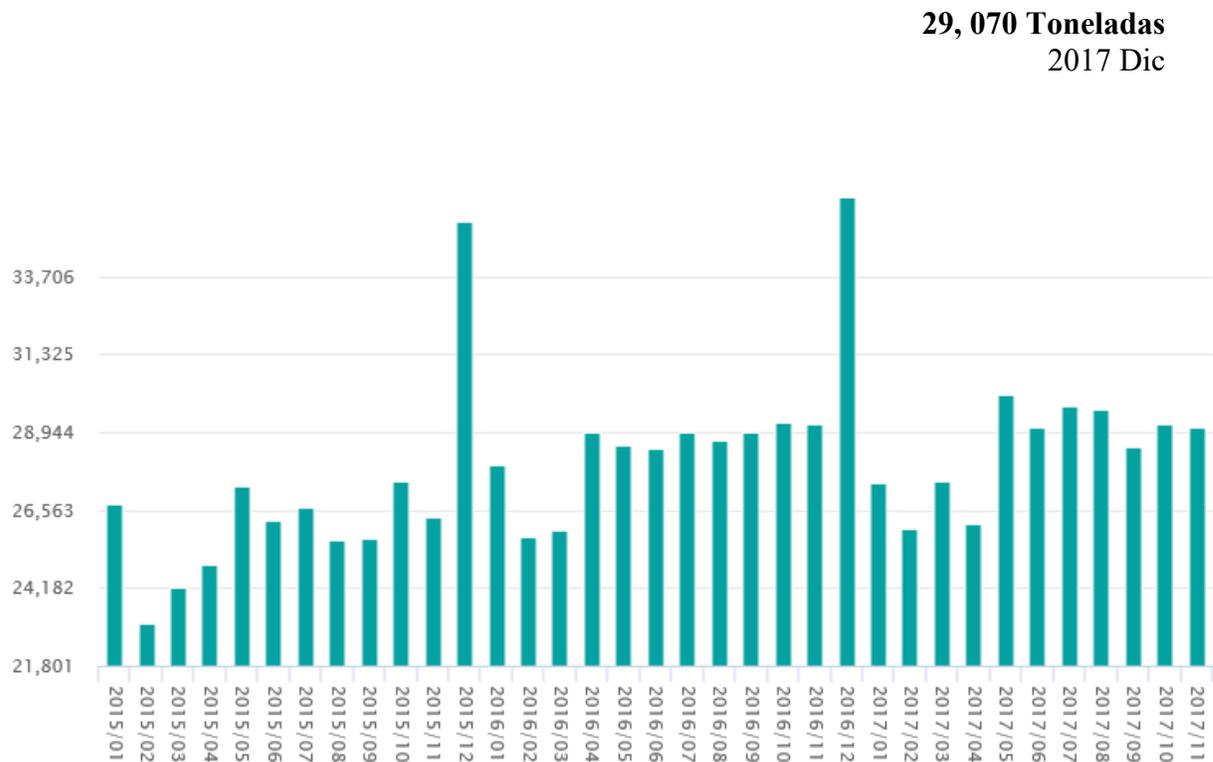
INEGI Estadísticas de Sacrificio de Ganado en Rastros Municipales.

Consultado el día 30 de noviembre de 2017 de <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/ganado/>

En el cuadro número 1, se observa la producción a nivel nacional de diferentes especies ganaderas de consumo humano, desde el monto total en diciembre de 2016, hasta el monto total de diciembre de 2017, todo esto en el transcurso de un año.



Figura 3. Cifras preliminares a partir de 2017/01 [Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018].



Cifras preliminares a partir de 2017/01

Fuente:

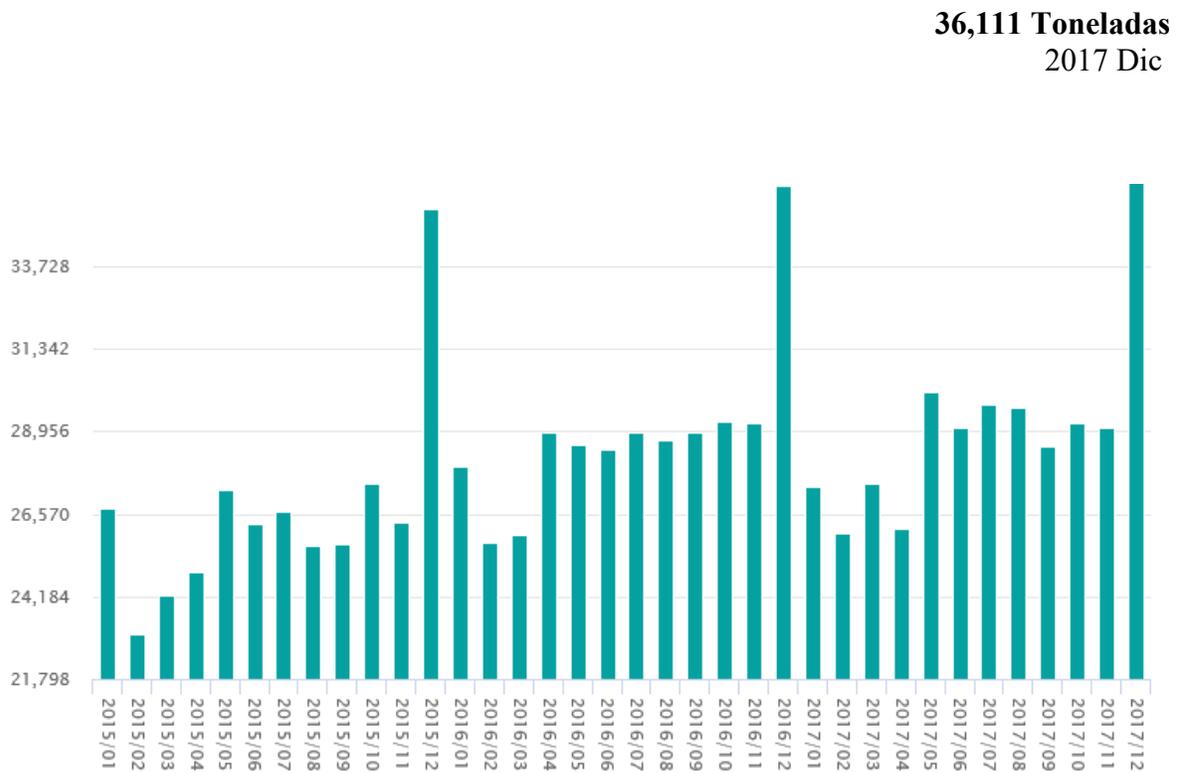
INEGI Estadísticas de Sacrificio de Ganado en Rastros Municipales.

Consultado el día 30 de noviembre de 2017 de <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/ganado/>

En la figura número 3, se observan las cifras preliminares de la carne de cerdo, el año, el mes (en el eje de las abscisas) y las toneladas recaudadas (en el eje de las ordenadas) de la carne de cerdo producida a partir de enero del año 2015 hasta noviembre del año 2017



Figura 4. Volumen de la producción de la carne en canal de ganado [Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018].



Cifras preliminares a partir de 2017/01

Fuente:

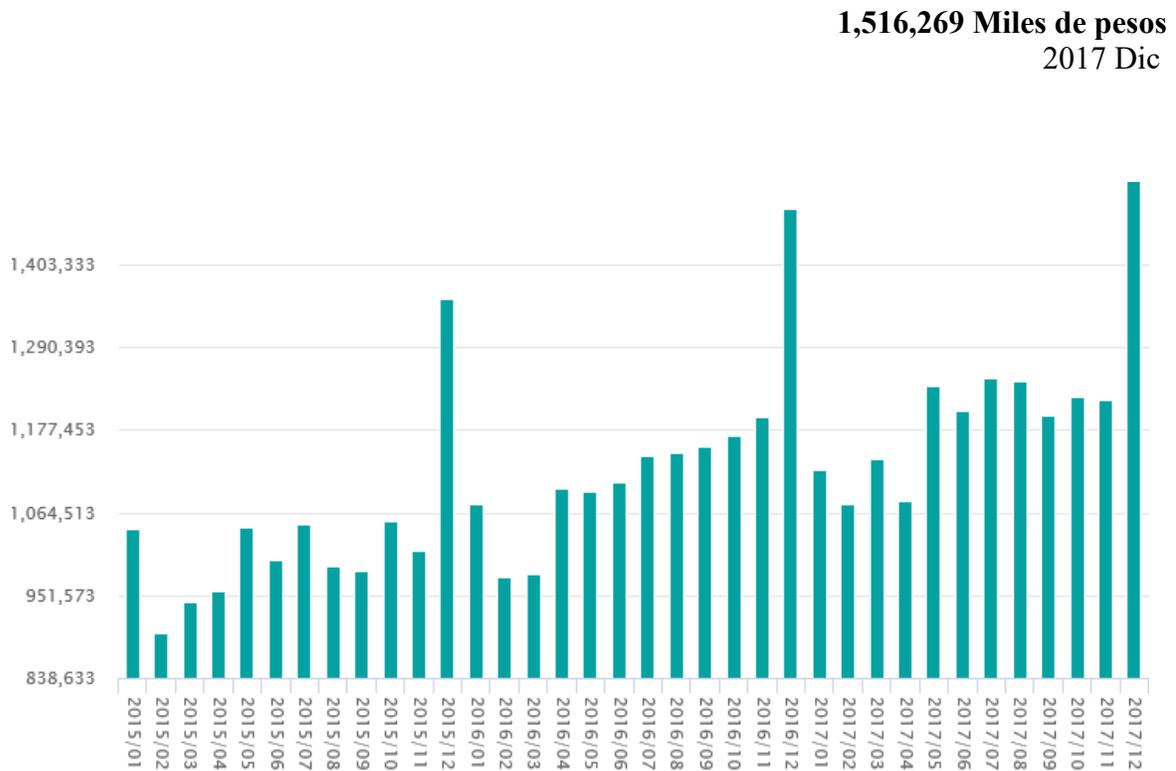
[INEGI Estadísticas de Sacrificio de Ganado en Rastros Municipales.](http://inegi.org.mx/temas/ganado/)

Tomado el día 30 de noviembre de 2017 de <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/ganado/>

En la figura número 4, se observa el año y el mes (en el eje de las abscisas) y las toneladas recaudadas (en el eje de las ordenadas) del volumen de la carne de cerdo producida a nivel nacional a partir de enero del año 2015 hasta diciembre del año 2017



Figura 5. Valor de la producción de la carne en canal de ganado en México [Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018].



Cifras preliminares a partir de 2017/01

Fuente:

[INEGI Estadísticas de Sacrificio de Ganado en Rastros Municipales.](http://inegi.org.mx/estadisticas/sacrificio-de-ganado-en-rastros-municipales)

Consultado el día 30 de noviembre de 2017 de <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/ganado/>

En la figura número 5, se observa el año y el mes (en el eje de las abscisas) y el dinero recaudado (en miles de pesos, en el eje de las ordenadas) del valor de la producción de la carne en canal de ganado en México a partir de enero del año 2015 hasta diciembre del año 2017

Nota: Las gráficas y cuadros aquí mostrados varían con respecto a la fecha de consulta, debido a los constantes cambios en la producción, consumo y distribución de la carne de cerdo a nivel tanto nacional como mundial y su constante actualización en la fuente citada.



3. Enfermedades respiratorias del cerdo

Las enfermedades respiratorias que afectan al cerdo son responsables de un elevado número de pérdidas económicas en las explotaciones porcinas de todo el mundo, ya que originan una disminución de los rendimientos de los animales, un mayor consumo de piensos, una dilatación de los ciclos productivos (cebo) y una pérdida de calidad en las canales que puede incluso suponer el decomiso de éstas en el matadero. Existen multitud de agentes etiológicos responsables de producir este tipo de enfermedades en el ganado porcino, pudiendo actuar, además, de una forma individual o colectiva, en cuyo caso se hace difícil identificar el agente y dar soluciones concretas. Las patologías respiratorias presentan cuatro orígenes fundamentales que son: Bacteriano, Vírico, Parasitario y Micótico. El conocimiento de estos cuadros de enfermedad podrá establecer la base de su prevención y control, o en su caso de su diagnóstico y tratamiento [Caballero de la Calle, J.R, 1996].

4. Enfermedades de origen bacteriano

Son las causantes principales de las anomalías respiratorias en el ganado porcino, tanto por el elevado número que suponen como por la complejidad de los cuadros que originan. Podemos encontrar hasta un total de seis enfermedades diferentes que cursan con alteraciones del árbol respiratorio de los animales que son: la **Rinitis trófica**, la **Neumonía enzoótica**, la **Poliserositis fibrinosa** o **Enfermedad de Glässer**, la **Pleuroneumonía Contagiosa**, la **Neumonía por *Salmonella*** y la **Tuberculosis**. La causa más común de pérdidas en la producción porcina debidas a enfermedades respiratorias es la Neumonía enzoótica. Aunque realmente sus efectos son difíciles de valorar, y están muy influenciados por las condiciones medioambientales y de manejo, provoca una disminución de las ganancias diarias de peso en los lechones a partir de las cuatro semanas de edad, 16% entre los 8 y los 85kg, pérdidas en la eficacia de la alimentación (12-13%), aumento de las enfermedades oportunistas y lo que es más importante, un deterioro en la calidad de las canales que pueden llegar incluso a ser decomisadas en el matadero. La Rinitis atrófica afecta a los lechones entre las tres y las ocho semanas de edad (son más sensibles los más jóvenes), causando un perjuicio económico en las explotaciones que es variable según la virulencia del germen y el grado de control que se ejerza sobre la enfermedad. Tanto la *Pasterella multocida*, como la *Bordetella bronchiseptica* tienen facultades para ser causas por sí mismas de problemas respiratorios en los cerdos. La Pleuroneumonía contagiosa es una enfermedad que afecta a los cerdos de todas las edades y que causa grandes trastornos en sus ciclos productivos, tanto por sí misma, ya que origina el 100% de morbilidad en la población y el 20% de mortalidad, como acompañada y complicada por infecciones de *Streptococcus suis* que acentúan los síntomas (neumonías) y aumentan las bajas en el colectivo afectado [Caballero de la Calle, J.R, 1996].



5. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

5.1 Antecedentes

La Pleuroneumonía Porcina causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* es una enfermedad contagiosa que causa importantes pérdidas económicas en todo el mundo. Los principales signos clínicos de la enfermedad aguda son anorexia, depresión, fiebre, tos, disnea y/o polipnea [Gottschalk, M, 2012]. Responsable primario de la Pleuroneumonía Porcina, así como agente involucrado directamente dentro del Complejo Respiratorio Porcino (CRP), la enfermedad puede evolucionar muy rápidamente y a las pocas horas se puede producir la muerte de algún animal. También puede tomar una forma crónica donde los signos clínicos no son tan evidentes, pero produce pérdidas de producción, y por lo general, se observan lesiones en los canales (como adherencia, pleuritis y abscesos pulmonares). En muchas explotaciones *App* está presente en una forma subclínica. Esto sucede a menudo en los rebaños convencionales, que pueden estar infectados simultáneamente no sólo con diferentes serotipos de baja patogenicidad, sino también con serotipos más virulentos [Gottschalk M, 2012]. En este último caso, los brotes pueden aparecer de repente en presencia de enfermedades concomitantes o como consecuencia de medidas de manejo. Por lo tanto, la identificación temprana de los rebaños infectados subclínicamente es importante para el control total de la enfermedad, los animales portadores son una de las principales fuentes de transmisión entre los rebaños. La presentación de un brote de enfermedad clínica está relativamente bien controlado en los EE. UU. y Canadá, pero es un problema importante en muchos países de América Latina, el Caribe, Asia y Europa. En América del Norte, los esfuerzos se han dirigido principalmente a monitorizar infecciones subclínicas en la cría de rebaños y mantenerlos libres de cualquiera de los serotipos comunes más virulentos de *App* o de todos los serotipos de *App* [Gottschalk M, 2012].

Actinobacillus pleuropneumoniae fue observada por primera vez en 1931 por Shope denominando al agente etiológico como *Haemophilus parahaemolyticus*. Años más tarde él y otros investigadores lo denominaron *Haemophilus pleuropneumoniae* debido a que observaron que *Haemophilus parahaemolyticus* y *Haemophilus pleuropneumoniae* eran idénticos [Pohl S; et al; 1983]. Posteriormente el agente causal fue transferido al género *Actinobacillus*, quedando definitivamente clasificado como *Actinobacillus pleuropneumoniae* [Pohl S; et al; 1983]. La PP es una enfermedad de elevada diseminación, altamente contagiosa, y en muchas ocasiones letal en cerdos desde el destete al sacrificio. Provoca en el 30-50 % de los cerdos una pleuritis fibrinosa con adherencias costales bastante características y elevada mortalidad en cuadros agudos, con elevado retraso del crecimiento en las formas crónicas. El *App* además está involucrado en cuadros de otitis media, artritis y osteomielitis. Es importante diferenciar infección de enfermedad, necesitando varios condicionantes para la manifestación clínica tanto de uno como de otro, como son la mezcla



de animales multiorigen (en este caso de diferentes razas de puercos), mal manejo, infecciones concurrentes y factores de estrés. En USA y Canadá la enfermedad está relativamente controlada [Universo porcino, el portal del cerdo, 2005].

Sólo los cerdos son susceptibles a *App*, no ha sido aislado de roedores, seres humanos, aves, y no persiste en el medio ambiente. Sin embargo, se puede producir la enfermedad en ratones al inocular grandes cantidades de bacterias, como pueden ser por vías intraperitoneal o intranasal [VERDUGO, D. I. E; *et al*, 2003].

5.2 Características

App es un pequeño cocobacilo pleomórfico, anaerobio facultativo, que mide 0.5-1.0 x 1.0-2.0µm; es gram negativo, encapsulado, inmóvil, por lo general productora de hemolisina Beta y dependiente del factor V de coagulación de la sangre (NAD⁺) para su crecimiento (el biotipo I, mientras que el biotipo II es independiente), y en los cultivos iniciales, una atmósfera (preferiblemente) con un 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C al menos en los cultivos iniciales por 24 horas, o menos en los subcultivos, produce colonias redondas, pequeñas (1 mm de diámetro o menos), lisas y brillantes o mates y de aspecto céreo, de color gris blanquecino y olor característico y no forma esporas. Estructuralmente, en la membrana externa se incluye el lipopolisacárido (LPS) y diferentes tipos de proteínas de interés. La cápsula es, también, una estructura de gran importancia que se relaciona con la patogénesis y que es muy útil en la clasificación. En aislamientos recientes se ha descrito la presencia de fimbrias [Pohl S; *et al*; 1983].

5.3 Cultivo

Basado en el requerimiento de Nicotin Adenin Dinucleótido (NAD⁺), *Actinobacillus pleuropneumoniae* se divide en dos biotipos, el biotipo I que incluye a las cepas NAD⁺, por lo que se requiere agregar una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* para su cultivo, la cual, lleva a cabo una reacción de complementación entre una cohemolisina de *App* con una esfingomielisina de *Staphylococcus aureus*. Para posteriormente observar el satelitismo alrededor de la cepa nodriza. Se observa una mayor extensión de la zona de hemólisis cercana a la cepa nodriza (fenómeno conocido como CAMP). Las cepas del Biotipo II no requieren de factor NAD⁺ para su crecimiento [Gottschalk, M. y Taylor D.J., 2006].

Las bacterias del grupo del *App* colonizan normalmente la cavidad nasal y las tonsilas, pero algunas cepas virulentas pueden descender hasta los pulmones y provocar la enfermedad [Gottschalk M y Taylor D.J., 2006]. Para su identificación, se realizan diferentes pruebas bioquímicas las cuales nos permiten diferenciar a especies semejantes a *App*; como se



menciona en el cuadro número 2, se muestran algunas determinaciones principales y diferencias metabólicas entre *App* y algunas especies próximas a la bacteria.

No se consideran microorganismos muy exigentes y crecen bien en distintos tipos de medios de cultivo (suplementados con NAD) aunque los medios ricos en glucosa, minerales y vitaminas, producen mejores crecimientos y estos son más rápidos. Habitualmente se utiliza agar chocolate suplementado con β -NAD (0.025-0.07%). Alternativa mente se utilizan también agar PPLO suplementado y agar sangre (5% de sangre), inoculando una estría nodriza de *Staphylococcus aureus* o *S. intermedius*, que producen NAD y permiten un crecimiento satélite [Fenwick B., *et al*, 1994]. En muestras muy contaminadas se utilizan medios selectivos (con bacitracina, cloxacilina o lincomicina) [Rapp VJ; *et al*, 1985].

Cuadro número 2. Determinaciones principales y diferenciación metabólica entre *A. pleuropneumoniae* y especies próximas [Gottschalk M; *et al*, 2006].

Carácter/actividad	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. suis</i>	<i>A. indolicus</i>	<i>A. porcinus</i>	<i>A. minor</i>	<i>H. parasuis</i>	<i>P. multocida</i>
Ácido de glucosa	+						
Ácido de manitol	+	-			-	-	(+)
Ácido de xilosa	+	+				-	V
Ácido de ribosa	+					+	
Ácido de lactosa	D	+			+	-	(-)
Ureasa	+	+			-	-	-
β -galactosidasa	+						
Fosfatasa alcalina	+						
Nitratos	+	+				+	
SH ₂	+						
Hemólisis	+	+	-	-	-	-	-
CAMP	+	-	-	-	-	-	-
V-dependencia	+	-	+		+	+	-
X-dependencia	-	-	-	+	-	-	-
Catalasa	Variable		+	-	-	+	
Producción de Indol	-		+	-	-	-	



En el cuadro número dos, se muestran algunas pruebas principales y diferencias metabólicas que pueden presentar *A. pleuropneumoniae* y algunas especies próximas a la bacteria, así como la diferenciación metabólica entre *A. pleuropneumoniae* y sus próximas especies.

5.4 Adhesión

Se define a la adhesión bacteriana como la asociación específica y relativamente estable entre la célula bacteriana y una superficie, la que puede ser otra célula o productos celulares. En este fenómeno participan principalmente dos moléculas: se denomina adhesina a la molécula o estructura de la superficie que participa en el proceso por parte de la bacteria y receptor a la parte complementaria en el hospedero o en el ambiente. La adhesión es indispensable para la bacteria como un paso inicial para un proceso de colonización, tanto para las bacterias de la microbiota como para las bacterias patógenas, las que originan un proceso infeccioso y en consecuencia una enfermedad. Para muchas bacterias la adhesión es también importante para su mantenimiento en los tractos o tejidos, ya que su capacidad de anclaje evita su eliminación por los mecanismos propios del hospedero, entre éstos se encuentran la acción de limpieza de fluidos biológicos tales como el moco entérico, la sangre, la orina, así como el transporte mucociliar, e incluso la microbiota normal previamente establecida [VERDUGO, D. I. E; *et al*, 2003].

Los receptores de células animales se encuentran formando parte de la membrana o de su superficie externa, como las glicoproteínas receptoras llamadas integrinas. Otras proteínas receptoras son las de matriz extracelular (MEC) y las presentes en el plasma [VERDUGO, D. I. E; *et al*, 2003]. Las adhesinas son, por lo general, lectinas (proteínas que tienen afinidad por los azúcares) y su función es la adherencia. La mayoría de las bacterias expresan más de un tipo de adhesinas. En algunos casos, la fimbria posee dos o más adhesinas distintas para dos o más receptores diferentes y se les llama adhesinas fimbriales. Las adhesinas que no están en fimbrias son denominadas adhesinas afimbriales y algunos ejemplos son: proteínas de membrana externa de las bacterias gramnegativas, ácidos lipoteicoicos de bacterias grampositivas, glucocalix, proteínas F y M de *Streptococcus sp.* y tienen como función unirse en forma estrecha a la célula hospedera [Molina, L. J., 2017]. Se ha demostrado que la adherencia al colágeno porcino es más evidente en los serotipos 1 y 7 [Enríquez, V, I; *et al*, 2014]. Para una mejor descripción sobre las adhesinas fimbriales, en la figura número 3, se muestra un esquema de las adhesinas fimbriales, su constitución y las moléculas que interactúan.



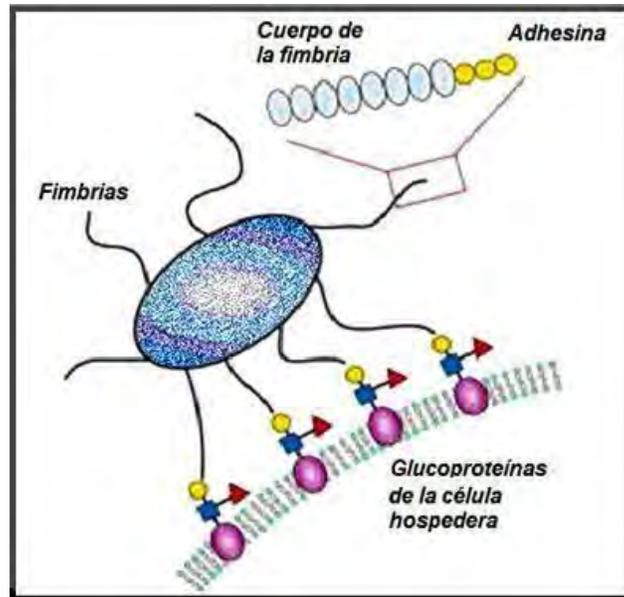


Figura 6. Las adhesinas fimbriales son parte constitutiva de una fimbria, y las moléculas encargadas de asegurar la adhesión de esa estructura a su receptor en la célula hospedera. Consultado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html> el día 15 de Diciembre de 2017.

5.5 Serotipos

El conocimiento del serotipo (tipificación) es muy importante, tanto en la epidemiología como en el control de la enfermedad. Los métodos tradicionales (inmunológicos) presentan el inconveniente de numerosas reacciones cruzadas debidas al LPS o a otros antígenos citoplasmáticos, por manipulación inadecuada de glucosa [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002]. Basado en el requerimiento de NAD^+ , dos biotipos han sido descritos: el biotipo 1 (que incluye a las cepas que requieren de NAD^+) y el biotipo 2 (que comprende cepas que no necesitan el suplemento de NAD^+ para su crecimiento *in vitro*) [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002]. En el biotipo I se incluyen 15 serotipos designados con números (1-15) [Chiers, K; *et al*, 2010]. Mientras que las pertenecientes a los serotipos 13 y 14 son NAD independientes (biotipo 2) [Vitelio, T, (Sin año de publicación)]. En los serotipos 1 y 5 se han descrito dos subtipos (a y b). Crece bien en agar chocolate, agar PPLO o agar sangre, suplementados con 0.025% de NAD, y según el caso, extracto de levadura, suero y glucosa [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002]. Un serotipo se identifica por sus antígenos K, O y H [Tortora, G. J., 2007].

En la cápsula se localizan antígenos de serotipo, con variaciones en la composición, estructura y desarrollo capsular (los serotipos 1, 3 y 5 poseen la cápsula más gruesa). Se han descrito fimbrias en la mitad de los aislamientos, aunque se pierden por subcultivo. El LPS incluye el lípido A y el polisacárido O (Ag O), que presenta cadenas laterales de longitud y



estructura variable, según el serotipo. Algunos serotipos comparten el Ag O (grupos 1, 9 y 11; 4 y 7; 3, 6 y 8) mientras que en otros forma parte de la composición que le define. Se han descrito cepas lisas (serotipos 2, 4 y 7), semirrugosas (serotipos 1 y 5) y rugosas (serotipos 3 y 6), según la presencia completa, parcial o ausencia de cadena laterales O. En la membrana externa existen diversos tipos de proteínas (OMP) de mucho interés, algunas de las cuales son comunes a muchos serotipos y otras especies próximas [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002].

Las proteínas de la membrana externa (PME) también son antígenos importantes. Se incluyen lipoproteínas y otras proteínas que se expresan en presencia de maltosa o ausencia de hierro libre (condiciones limitantes). Finalmente, algunas sustancias solubles que son secretadas durante el crecimiento microbiano poseen carácter antigénico, entre las que destacan las toxinas RTX [Shakarji, L; *et al*, 2006].

5.6 Epidemiología, resistencia en el ambiente y a factores fisicoquímicos

La transmisión de la enfermedad parece ocurrir directamente desde un cerdo infectado a un cerdo susceptible, ya que no se sabe si *App* sobreviva mucho en el entorno circundante. Sin embargo, en brotes agudos, el agente patógeno puede transmitirse de un corral a otro, lo que sugiere que es posible la transmisión por vía aérea o por personal de granja que transporte exudado contaminado de cerdos infectados. Debido a que los cerdos pueden transportar la bacteria sin ser detectados, la enfermedad a menudo se disemina mediante la introducción de nuevos cerdos en la manada. La probabilidad de que una pira esté expuesta a *App* aumenta con la cantidad de cerdos comprados al mismo tiempo. Aunque todos los grupos de edad son susceptibles a la enfermedad, los cerdos en crecimiento parecen ser los más susceptibles. Factores como el movimiento, la aglomeración y las condiciones climáticas adversas juegan un papel importante en el apoyo al inicio y la gravedad de la enfermedad. En México los serotipos reportados son el 1, 5, 7 y 15, sin embargo, se requiere un estudio de tipificación de mayor amplitud para confirmar y determinar los serotipos existentes [Terry, M. Lo, 1997].

El cerdo es el único hospedador natural de *App* [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002]. Los serotipos de *App* generalmente se distribuyen por ubicación geográfica, así mismo los serotipos 1, 5 y 7 se encuentran más comúnmente en los Estados Unidos, mientras que otros serotipos predominan en otras partes del mundo. Si bien algunos serotipos se consideran de baja virulencia en algunos países y no tienen importancia epidemiológica, pueden ser agentes de la enfermedad en otros países. Aunque existen límites geográficos aparentes, sigue existiendo el posible peligro de que se introduzca un nuevo serotipo en una manada libre de éste patógeno. Un brote típico de *App* produce aproximadamente un 50% de morbilidad y hasta un 10% de mortalidad [Terry, M. Lo, 1997].



Actinobacillus pleuropneumoniae es muy lábil en el medio ambiente, y en el laboratorio no sobrevive más de 3 días en caldo a temperatura ambiente (independientemente de que tenga o no suplementación con NAD⁺) o un poco más a 4°C. En suero a temperatura ambiente sobrevive hasta 12 días, multiplicándose en el caso de suplementar el medio con NAD⁺ o bajar la temperatura a 4°C, aunque a esta temperatura y suplementado, la supervivencia sólo llega a los 18 días. El uso de temperaturas de 80°C en un medio con leche descremada y glicerina, al igual que la liofilización resultan adecuados para su conservación prolongada. Sin embargo, es muy diferente lo que puede suceder en condiciones de campo en las que el microorganismo se encuentra protegido por las secreciones nasales y fluidos orgánicos que le permiten una mayor supervivencia [Chiers, K; *et al*, 2010].

La transmisión de la enfermedad de cerdos portadores sanos o portadores crónicos juega un papel crucial en la epidemiología de la enfermedad y representan la principal fuente de infección de cerdos susceptibles [Gottschalk, M y Taylor, 2006], reportan su dispersión por contacto directo o a través de aerosoles. El modo de transmisión aéreo no parece ser una manera común de contagio. Desrosier, R, (1984) no fue capaz de demostrar la transmisión de la infección por vía aérea durante un periodo de 2 meses en un ensayo en donde cerdos susceptibles fueron mantenidos separados de animales infectados en forma aguda y mantenidos a 3 metros de distancia de los enfermos.

5.7 Factores de virulencia y patogenia

Los factores de virulencia son los responsables de las reacciones que ocurren durante los procesos de una enfermedad, por tanto, el estudio de los factores de virulencia permite entender los mecanismos usados por la bacteria para causar la enfermedad. La patogénesis de *App* se considera multifactorial, ya que esta bacteria cuenta con varios factores de virulencia, como son, los componentes estructurales: cápsula, adhesinas, LPS, PME y los factores de secreción: proteasas y exotoxinas, que son secretadas por el microorganismo [VERDUGO, D. I. E; *et al*, 2003].

La infección se transmite por aerosol o por contacto directo entre animal enfermo y animal sano. *App* coloniza el tracto respiratorio en el huésped y persiste en las tonsilas, (sitio primario de colonización) [Gottschalk, M y Taylor, 2006] además del epitelio sano de los pulmones y lesiones adyacentes [Buettner, F. F., *et al*, 2008], causando que la enfermedad sea de tipo aguda o de tipo crónica; su patogenicidad es multifactorial, y está integrada por distintos factores estructurales y de secreción. Entre los primeros se incluyen componentes de la membrana externa (PME), los LPS, la cápsula, las fimbrias, mientras que en los segundos se incluyen las toxinas [Chiers, K; *et al*, 2010].



Cuando persiste en pulmones necróticos, tonsilas y en cavidad nasal llega a provocar la enfermedad crónica. El tipo crónico suele ser muy contagioso, debido a su persistencia en el cerdo y generalmente resulta en la muerte del animal. Las lesiones en el tejido respiratorio son dadas tanto por las toxinas Apx y otros compuestos (polisacáridos capsulares, proteasas y lipopolisacáridos).

Cápsula

Es la responsable de la especificidad del serotipo de *App* y se reconocen 15 serotipos del biotipo I debido a la presencia del antígeno capsular. Los fosfatos y el ácido carboxílico le confieren una carga negativa. Las propiedades biológicas de la cápsula son: no tiene actividad tóxica, es inerte, no tiene actividad pirogénica, debido a la carga negativa hay resistencia a la fagocitosis por neutrófilos, es opsonizada por anticuerpos e interfiere con la actividad del complemento. Los anticuerpos generados contra la cápsula protegen contra la muerte, pero no contra la enfermedad o contra la infección crónica. La virulencia atribuida a la cápsula es variable entre los diferentes serotipos, pero se requiere la cápsula para que la bacteria sea virulenta [VERDUGO, D. I. E; *et al*, 2003].

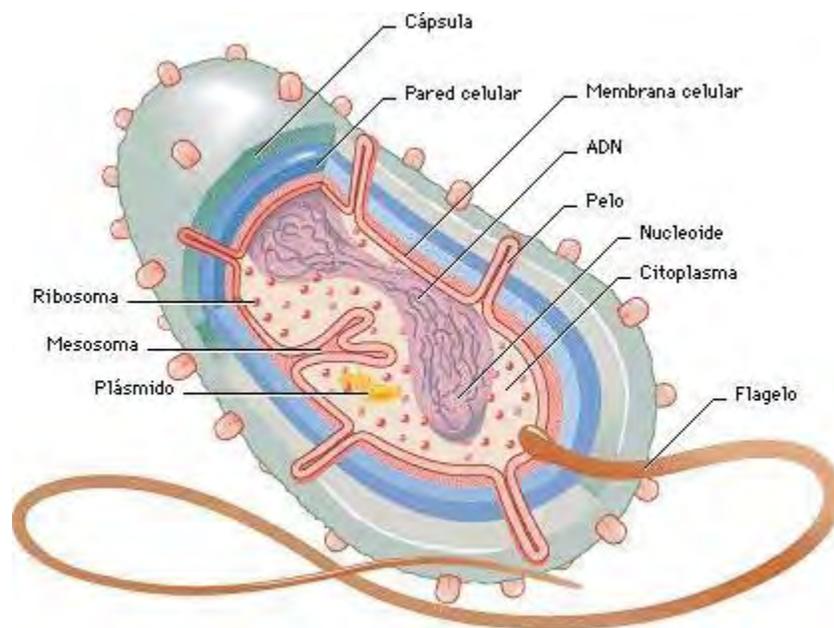


Figura 7. Esquema de una estructura bacteriana: Se puede observar los diferentes componentes que conforman a una bacteria, como son cápsula, pared celular, membrana celular, flagelo, entre otros. Tomado de https://docs.google.com/document/d/1RLfjXlAdy2PQZGJzQo7C6rECmXV8BUN0oAVVehInK_Y/mobilebasic?hl=en_US el día 22 de junio de 2018



La cápsula es antifagocítica y se considera protección principal frente a las defensas humorales [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002]. El grado de desarrollo de la cápsula varía según los serotipos encontrándose mientras que en los serotipos 1, 3 y 5 está bien definida, en los 2 y 7 la cápsula es pequeña [Shakarji, L; *et al*, 2006].

Lipopolisacáridos (LPS)

Biológicamente es similar al de otras Gram negativas y se admite que, en la enfermedad natural, es sinérgico con las toxinas Apx. Después de su inoculación intratraqueal, no se observan ni necrosis ni hemorragias, aunque permite la adherencia de *App* al mucus y a los anillos traqueales, y consecuentemente, desempeña un papel fundamental en la colonización. También es un mecanismo alternativo de adquisición de hierro *in vivo*, a través de su unión a la hemoglobina porcina [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002].

Los LPS son los principales constituyentes de la membrana externa y poseen propiedades semejantes a las de otros Gram negativos, asociadas a su carácter de endotoxina. Se ha demostrado que intervienen en la capacidad de adhesión de la bacteria al epitelio y al moco traqueobronquial, aumentan el efecto de las toxinas Apx sobre macrófagos para la producción de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8) que desempeñan una importante función en la patogenia de la enfermedad respiratoria [Auger, E; *et al*, 2009; Bandara, A.B; *et al*, 2003]. En la pleuroneumonía porcina se han descrito niveles altos de IL-6, IL-1 y TNF- α en el suero de los animales enfermos y en células de lavado pulmonar 2-4 horas post-infección. El TNF- α aparece tanto en procesos agudos como en crónicos. También induce necrosis del epitelio alveolar por unión a receptores de membrana. Incluso representa una alternativa en la captación del hierro, a partir de la hemoglobina [Auger, E; *et al*, 2009].

El LPS es similar al encontrado en otras bacterias gramnegativas. La cadena O específica, le confiere las características fenotípicas de cepas lisas, semirrugosas y rugosas. El antígeno O es el responsable de las reacciones cruzadas entre los serotipos. Las propiedades biológicas del LPS son: tiene actividad de endotoxina, gelifica a los amebocitos del género *Limulus*, produce reacción de Schwartzman, actúa como un pirógeno, induce la liberación de mediadores proinflamatorios y estos mediadores activan varias células, como macrófagos y neutrófilos y juega un papel importante en la inflamación aguda. La administración de LPS de *App* a cerdos induce neumonía no necrosante con infiltración de neutrófilos [VERDUGO, D. I. E; *et al*, 2003].



Exotoxinas

Las exotoxinas son el factor de virulencia más importante de *App*, todas las cepas virulentas producen de 1 a 2 toxinas RTX, denominadas Apx I, Apx II y ApxIII. Las Apx forman poros en las membranas celulares, lo que conduce a la lisis de sus células blanco. Apx I, Apx II y Apx III son citotóxicas para células del epitelio alveolar, células endoteliales, eritrocitos, macrófagos alveolares y neutrófilos. La presencia de una y otra, depende de la cepa y el serotipo, de tal modo que algunos serotipos son capaces de producir diferentes combinaciones de dos de ellas, mientras que otros producen solamente Apx I ó Apx II [Bosse' J.T; *et al*, 2002; Chiers, K; *et al*, 2010].

Las exotoxinas bacterianas son proteínas extracelulares solubles, que, al ser liberadas al medio por el organismo vivo, se activan bioquímicamente. Se han identificado cuatro tipos de citotoxinas en *App*, las cuales son llamadas toxinas Apx, que pertenecen a la familia de las toxinas RTX formadoras de poros. En el cuadro número 3, se muestran las distintas toxinas que produce *App*, así como los serotipos involucrados y las distintas exotoxinas que produce cada serotipo.

- Apx I: Proteína de 105 kDa, fuertemente hemolítica y fuertemente citotóxica. Es codificada por el operón ApxI, que tiene 4 genes: ApxIC (activador), ApxIA (pretoxina), ApxIB y ApxID (aparato de secreción). La proteína ApxI la producen los serotipos 1, 5a, 5b, 9, 10 y 11 y por lo tanto son los más virulentos.
- Apx II: Proteína de 103-105 kDa, débilmente hemolítica y débilmente citotóxica, es codificada por el operón ApxII y consiste de 2 genes: ApxIIC y ApxIIA, utiliza los productos de los genes ApxIB y ApxID para secretarse, la producen todos los serotipos excepto el 10.
- Apx III: Proteína de 120 kDa, es no hemolítica y fuertemente citotóxica, codificada por el operón ApxIII y contiene 4 genes: ApxIIIC, ApxIIIA, ApxIIIB y ApxIIID. Apx III la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8.
- Apx IV: Proteína de 202 kDa específica para *App*, tienen actividad citotóxica y la producen todos los serotipos. La actividad hemolítica es débil y de estas proteínas es probablemente la responsable de las lesiones iniciales de la PP, caracterizadas por ser hemorrágicas y necrosantes. Las toxinas Apx son el principal factor de virulencia y en su ausencia la cepa de *App* es avirulenta [VERDUGO, D. I. E; *et al*, 2003].



Cuadro 3. Toxinas producidas por distintas cepas de *App* [Gottschalk, M; 2012]

Producción de toxinas*			
Serotipos de <i>App</i>	Apx I	Apx II	Apx III
1, 5, 9 y 11	Si	Si	No
2, 3, 4, 6, 8, 15	No	Si	Si
7, 12, 13	No	Si	No
10, 14	Si	No	No

En el cuadro número 3, se muestran todas las cepas que producen ApxIV, esta, es esencial para que la virulencia sea completa y solo se produce *in vivo*. Algunas cepas de serotipo 3 secretan bajos niveles de ApxII

Las toxinas también afectan a los linfocitos T, en particular con una disminución de CD3_CD8, lo que altera la respuesta inmunitaria y favorece la cronicidad del proceso. Como todas las cepas producen por lo menos una Apx, la enfermedad es indiferenciable desde el punto de vista clínico, lo que produce una mayor o menor gravedad en función del serotipo implicado [Faldyna, M; *et al*, 2005]. Asimismo, afecta a macrófagos alveolares, causando apoptosis [Chien M.S; *et al* 2009]. *App* produce una potente ureasa cuya participación en la patogenia parece tener lugar a largo plazo mediante la disminución de la respuesta inmunitaria local, lo que permitiría la persistencia de la bacteria.

Proteasas

Las proteasas de microorganismos son factores de virulencia, ya que hidrolizan componentes proteínicos del huésped y facilitan su invasión. *App* secreta enzimas proteolíticas hacia el medio de cultivo y éstas tienen actividad sobre varios sustratos como son la gelatina, hemoglobina. Las proteasas son probablemente inactivas cuando están dentro de la célula y se activan cuando se secretan, deduciéndose que podría facilitar la invasión de la bacteria a las mucosas del tracto respiratorio del cerdo. Las proteasas de esta bacteria patógena son metaloproteasas neutras y se proponen como un factor de virulencia, ya que pueden facilitar la colonización de este microorganismo. Una proteasa de alto peso molecular fue purificada de sobrenadantes de cultivo y caracterizada bioquímicamente. Anticuerpos contra esta proteasa reconocen a todos los serotipos de *App* [VERDUGO, D. I. E; *et al*, 2003].



Adhesinas

Se ha descrito que el LPS es una adhesina importante para el anclaje de la bacteria y se han propuesto algunos receptores posibles. Si bien se ha demostrado la presencia de fimbrias tipo IV que están localizadas en la superficie de las cepas de *App*, su papel en la adhesión no ha sido establecido, pero se piensa que funcionan en la adhesión a las células del hospedero como sucede en otras bacterias gram-negativas [VERDUGO, D. I. E; *et al*, 2003].

Fimbrias

La presencia de fimbrias también debe jugar un papel en la adherencia de la bacteria las superficies mucosas; poseen una proteína de 17-kd, que reacciona en forma cruzada con la fimbria tipo IV de *M. bovis*. La regulación genética asociada con la expresión de las fimbrias ha sido evaluada [Boekema, B. K; *et al*, 2004]. La expresión de dichos genes ha sido demostrada después que la bacteria entra en contacto con células epiteliales *in vivo* después de la inoculación experimental por vía endobronquial.

Proteínas de membrana externa

Se han identificado varias proteínas de membrana externa (PME) en *App* y todos los serotipos contienen varias proteínas comunes, incluyendo una lipoproteína asociada al peptidoglicano llamada PalA, una proteína modificable por calor, además de una de 48 kDa que no está presente en otras especies gram-negativas, relacionada con la patogénesis del tracto respiratorio del cerdo. Las PME son importantes en la regulación de proteínas de superficie en respuesta a las condiciones de crecimiento en el medio ambiente y se ha determinado su participación como receptores para elementos indispensables para su crecimiento, además de que estas proteínas son capaces de inducir cierta respuesta inmunológica [VERDUGO, D. I. E; *et al*, 2003].

En este grupo se incluyen las proteínas receptoras de transferrina (TbpA y TbpB) y otras, que participan en la virulencia. Los anticuerpos frente a ellas actúan como opsoninas en la fagocitosis o, simplemente, son protectores. La TbpA, codificada por el gen *tbpA*, posee un tamaño de entre 90 y 110 kDa, mientras que el tamaño de la proteína TbpB, codificada por el gen *tbpB*, oscila entre 80 y 90 kDa [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002]. También se han descrito otras proteínas, codificadas por los genes *tonB*, *exbB* y *exbD*, que forman el complejo TonB, implicado igualmente en esta función. En *A. pleuropneumoniae*, *exbB* y *exbD* están en el mismo operón que los *tbp*, a los que preceden, y son indispensables para el funcionamiento correcto de las proteínas Tbp. Las Tbp explican la especificidad de hospedador y permiten abastecer a estos microorganismos del hierro que necesitan. Un fallo en este sistema de



captación limitaría la multiplicación *in vivo*, siendo causa de atenuación [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002].

La lactoferrina, la transferrina y la hemoglobina son moléculas con alta afinidad por el hierro que reducen la disponibilidad de este mineral para patógenos potenciales. La capacidad para captar hierro de estas moléculas ha sido demostrada en las cepas patógenas de *App* a través de ciertas proteínas de membrana que son expresadas *in vivo*. Recientemente se ha demostrado que una proteína de la membrana externa de *App* de 60 kDa es responsable de la adherencia al colágeno presente en el pulmón del cerdo y pudiera ser un factor importante en la patogénesis de la enfermedad. Se ha demostrado que la adherencia al colágeno porcino es más evidente en los serotipos 1 y 7 [Vitelio, T. (Sin año de publicación)].

5.8 Inmunidad

Uno de los elementos claves que determinan la evolución de la enfermedad en los rebaños afectados lo constituye la inmunidad contra el agente causal, una vez que un animal se recupera de la infección, adquiere protección contra el desafío por todos los serotipos de *App*. El control de la enfermedad mediante bacterinas elaboradas a base de células completas ha sido tradicionalmente insatisfactorio induciendo una pobre inmunidad que solo es serotipo-específica. Una típica respuesta inmunitaria primaria solo es evidente en lechones que no poseen anticuerpos calostrales al momento de ser desafiados. La vacunación de las madres ha demostrado poseer un efecto positivo en la estabilización de la inmunidad del rebaño y en reducir la incidencia del problema en cerdos destetados. El uso de vacunación simultánea contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y *App* ha demostrado ser efectivo para garantizar un buen nivel de inmunidad calostrales contra ambas enfermedades. La inmunidad calostrales posee un efecto protector contra la infección por *App*. La duración de la inmunidad pasiva varía entre 2 a 8 semanas dependiendo del nivel de anticuerpos adquiridos. No existe correlación entre los niveles de inmunoglobulinas dirigidos contra antígenos capsulares serotipo específicos y la protección. Esto contrasta con la inmunidad protectora asociada con el nivel de anticuerpos específicos contra las toxinas Apx [Vitelio, T. (Sin año de publicación)].

El sistema inmunológico del pulmón interviene de forma esencial, tanto en la respuesta inespecífica (a través de la fagocitosis), como específica (humoral y celular), mediante la activación de los linfocitos locales. En la respuesta humoral intervienen IgA ó IgG, respectivamente, en los tramos superiores o profundos. A nivel celular, se ha observado un incremento del número de linfocitos T (CD4 y CD8) en el tejido linfoide asociado a los bronquios, así como de células plasmáticas que expresan IgM, IgA e IgG y una concentración alta de neutrófilos en los lavados pulmonares (normalmente están ausentes). En el suero de los convalecientes existen anticuerpos frente a la cápsula, el LPS, OMPs y proteínas secretadas (Apx). Los anticuerpos frente a la cápsula y antígeno O de algunos serotipos (2, 5, 10 y 12) son específicos de serotipo, mientras que el antígeno O de los serotipos 4 y 7; 1,



9 y 11 y 3, 6 y 8 comparte epítomos [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002]. El antígeno O es inmunodominante y encubre la respuesta frente a otros antígenos expuestos. Los sueros de los convalecientes reconocen también varias OMPs de 45, 50 y 66 kDa, Tbp de unión a transferrina, toxinas Apx y algunas otras. La inmunidad pasiva, en los lechones, procede de la madre, a partir del calostro y leche, donde los niveles de IgG e IgM dependen de su transferencia desde la sangre, aunque una pequeña cantidad y las IgA, se sintetizan en la mama. Los lechones que toman calostro de madres inmunes, resisten el desafío intranasal, al contrario de los que se les suprime (mueren de septicemia). Este tipo de inmunidad protege 3-6 semanas después del nacimiento [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002].

App estimula la producción de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 β (IL-1 β), IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que se detectan en el líquido alveolar y las lesiones tisulares [Auger, E; *et al*, 2009].

5.9 Lesiones

Las lesiones patológicas macroscópicas se localizan principalmente en los pulmones y varían de acuerdo con el curso clínico de la enfermedad. La neumonía puede ser unilateral o bilateral, difusa o multifocal, y bien delimitada en los pulmones afectados y suele afectar a los lóbulos cardíaco y apical, así como al menos a parte de los lóbulos diafragmáticos [Zimmerman, J. J; *et al*, 2012]. Se limitan al aparato respiratorio [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002]. La neumonía bilateral que afecta a los lóbulos apicales, cardíacos y parte del diafragmático donde las lesiones neumónicas están focalizadas y bien definidas. Desde el punto de vista anatomopatológico, se definen las lesiones como: neumonía necrótica y fibrinohemorrágica con pleuritis fibrinosa [Formas clínicas y lesiones, (sin año de publicación)].

En las fases sobreaguda (si la evolución lo permite) y aguda, se desarrolla una neumonía fibrinoso-hemorrágica necrosante con pleuritis serofibrinosa. Las áreas afectadas presentan un color rojo negruzco o rojizo (la pleura), con adherencias fibrinosas a la pared costal y pericardio. En la cavidad torácica puede observarse líquido serosanguinolento y cuando el curso es muy rápido, tráquea y bronquios contienen exudado mucoso con coágulos de fibrina y los ganglios están edematosos. En la forma aguda pueden observarse cantidades variables de fibrina y adherencias pleurales [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002]. En las formas crónicas se aprecia un engrosamiento fibroso de la pleura y, en el parénquima pulmonar, las áreas de necrosis están limitadas por cápsulas gruesas, de color blanquecino, formando secuestros. Microscópicamente, en la forma sobreaguda, se observa congestión, trombosis, hemorragia, edema y exudación de fibrina. En la forma aguda hay focos de necrosis por coagulación, rodeados por células inflamatorias (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas). Igualmente, se observa fibrina, eritrocitos y neumocitos en la luz de los alvéolos. Los septos



interalveolares están engrosados y es frecuente la trombosis vascular. En la evolución a la forma crónica, desde la periferia de las áreas de necrosis progresa un tejido de granulación que es responsable del encapsulamiento y los secuestros, en los que quedan acantonadas bacterias [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002].

5.10 Signos clínicos

Los signos clínicos varían con la edad de los animales, su estado de inmunidad, las condiciones ambientales y el grado de exposición al agente infeccioso. El estado clínico de la PP puede ser agudo, hiperagudo o crónico. Todas las etapas de la enfermedad, desde la intermedia a la fatal, subaguda o crónica, pueden desarrollarse dentro de un grupo afectado [Zimmerman, J. J; *et al*, 2012]. Se considera, por regla general, que la incidencia de la pleuroneumonía porcina está ligada a variación estacional, siendo normal observar expresiones clínicas en épocas frías del año [Formas clínicas y lesiones, (sin año de publicación)].

Cuadro agudo [Formas clínicas y lesiones, (sin año de publicación); Gottschalk M, 2012].

En casos agudos, la pleuritis es muy obvia y la cavidad torácica contiene líquido sanguinolento. A medida que las lesiones avanzan, la pleuritis fibrinosa se vuelve fibrosa y puede adherirse tan fuerte a la pleura parietal que el parénquima pulmonar puede permanecer fijado a ésta cuando se extraen los pulmones en el examen postmortem. A continuación, se presentan los siguientes signos:

- En el mismo o en diferentes corrales dentro de la nave, aparecen muchos cerdos afectados con hipertermia (40,5 - 41°C). Los animales enfermos rechazan la comida, no quieren beber y están deprimidos.
- Se observan síntomas respiratorios graves: tos, disnea y ocasionalmente respiración por la boca. Se presenta insuficiencia cardíaca y circulatoria con congestión de extremidades.
- Evidente pérdida de condición corporal después de 24 horas de iniciarse la enfermedad.
- La evolución de la enfermedad difiere de unos animales a otros, dependiendo de la extensión de las lesiones pulmonares y del tiempo de iniciación del tratamiento terapéutico.
- La muerte se debe a una combinación de un fallo cardíaco y de toxinas producidas por el organismo.



- Es posible observar cualquier tipo de evolución: desde la muerte de animales en pocos días hasta la evolución a la forma crónica pasados unos días del inicio de la enfermedad.
- En la fase aguda de la enfermedad la morbilidad es muy alta (10 - 50%) y la mortalidad oscila entre el 3 - 30% en animales de engorde y superior al 40% en cerdos más jóvenes. Las tasas de morbilidad y mortalidad dependen de la virulencia de la cepa y de las condiciones ambientales en particular.

Cuadro hiperagudo [Formas clínicas y lesiones, (sin año de publicación); Gottschalk M, 2012].

En cuadros hiperagudos, la tráquea y los bronquios están llenos de exudado mucoso, espumoso y teñido con sangre. Las áreas neumónicas aparecen oscuras y sólidas con poca o ninguna pleuritis fibrinosa. Este cuadro se caracteriza por los acontecimientos siguientes:

- Aparición repentina de algunos animales muy enfermos con hipertermia (41,5 – 42°C), anorexia y apatía.
- Período breve de vómitos, diarrea leve, tos y epistaxis. Rápido incremento del pulso, insuficiencia cardíaca y respiratoria.
- Cianosis en piel de nariz, orejas, patas y, finalmente, de todo el cuerpo.
- Fase terminal:
 1. Posición de perro sentado. Disnea grave con respiración bucal y disminución brusca de la temperatura rectal.
 2. Secreción abundante, espumosa y teñida de sangre a través de los ollares nasales y de la boca, antes de la muerte.
 3. Muerte dentro de las 24 - 36 horas del desarrollo de los síntomas clínicos. En animales jóvenes la muerte puede presentarse tan rápidamente que no lleguen a observarse los síntomas anteriormente mencionados.
 4. En reproductoras se han descrito de forma ocasional abortos.
 5. Las tasas de morbilidad y mortalidad oscilan alrededor del 30 - 35%, dependiendo de la experiencia inmunológica de la explotación.

Cuadro crónico [Formas clínicas y lesiones, (sin año de publicación); Gottschalk M, 2012].

Los signos más representativos aparecen a continuación:

- Aparece después del cuadro agudo o al mismo tiempo. No existe fiebre y se observan tos variable e intermitente.



- Los cerdos afectados pueden transportar el microorganismo durante largos períodos de tiempo y por lo tanto representan un riesgo potencial para los cerdos más jóvenes.
- Apetito reducido, intolerancia al ejercicio (estos animales son los últimos en levantarse cuando se entra en la explotación). Los animales afectados presentan una neumonía caracterizada por respiración abdominal debido a una pleuritis muy dolorosa.
- Los signos clínicos pueden exacerbarse por otras infecciones respiratorias (bacterias, virus, micoplasmas).
- Los cerdos afectados pueden transportar el microorganismo durante largos períodos de tiempo y por lo tanto representan un riesgo potencial para los cerdos más jóvenes.
- Los cerdos sobrevivientes presentan un marcado retraso de crecimiento
- El serotipo 3 de *A. pleuropneumoniae* puede causar artritis, endocarditis y oscesos en diferentes localizaciones en animales individuales.

5.11 Patología macroscópica, lesiones [Boekema, B. K; *et al*, 2004; Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2018)].

Las lesiones patológicas macroscópicas se localizan principalmente en los pulmones (tomando en cuenta no sólo los pulmones sino todo el aparato respiratorio) y varían de acuerdo con el curso clínico de la enfermedad. La neumonía puede ser unilateral o bilateral, difusa o multifocal, y bien delimitada en los pulmones afectados y suele afectar a los lóbulos cardíaco y apical, así como al menos a parte de los lóbulos diafragmáticos.

Cuadro agudo

En los casos agudos, la tráquea y los bronquios están llenos de un exudado mucoso espumoso y sanguinolento, y pocos cambios graves pueden ser obvios. En los casos de peragulencia levemente posteriores, las áreas de neumonía aparecen de color rojo oscuro y de leves a moderadas, firmes y resistentes, con escasa o nula arritmia fibrionosa. En la superficie cortada hay hemorragia difusa y las áreas de necrosis son friables. En casos agudos, las capas de fibrina son obvias en la superficie pleural y con poca frecuencia en el epicardio y el pericardio en animales que viven durante al menos 24 horas después de la infección. Estas cavidades torácicas generalmente contienen un líquido teñido con sangre. Las áreas afectadas del pulmón son firmes, elásticas y de color rojo púrpura-oscuro a blanco, más claro en áreas que contienen abundante fibrina. En la superficie cortada, el parénquima es heterogéneo. Hay áreas de hemorragia y otras áreas que son necróticas y friables. Se observan líneas blancas de fibrina que rodean áreas necróticas y septos interlobulillares distendidos. En algunas áreas, los septos interlobulillares pueden estar distendidos con fluido rojo hemorrágico.



Cuadro hiperagudo

La tráquea y los bronquios están llenos de exudado mucoso, espumoso y teñido con sangre. Las áreas con neumonía fibrinohemorrágica severa presentan exudado fibrinoso y un color rojo oscuro. También podemos observar pleuritis serofibrinosa.

Cuadro crónico

En casos crónicos, la fibrosis de la pleuritis previamente fibrinosa produce adherencias firmes entre la pleura visceral y parental. Estas áreas a menudo provocan lagrimeo de los pulmones durante la extracción en la necropsia o en el matadero, dejando porciones de pulmón adheridas a la pared torácica. La resolución de las áreas no necróticas de la infección aguda da como resultado focos necróticos cavitados que permanecen rodeados por tejido cicatricial conocido como secuestro. En muchos casos menos severos, las lesiones en el parénquima pulmonar se resuelven, dejando sólo adherencias pleurales fibrosas. Se ha demostrado que una alta prevalencia de pleuritis fibrosa en la matanza es muy sugestiva de la aplicación previa de pleuroneumonía.

5.12 Patología microscópica, lesiones

En las áreas pulmonares afectadas de la forma aguda, se observa una intensa congestión, hemorragia y edema alveolar. En estos territorios los septos interlobulillares aparecen engrosados a causa del edema intersticial, con los vasos linfáticos dilatados, y presencia de células inflamatorias y eritrocitos entre las redes de fibrina [Formas clínicas y lesiones, (sin año de publicación); Gottschalk M, 2012; Zimmerman, J. J; *et al*, 2012]. Los alvéolos contienen células inflamatorias, células descamadas y fibrina. Las lesiones características consisten en áreas de necrosis por coagulación asociadas con vasculitis y trombosis. Alrededor de los focos de necrosis destaca una franja celular basófila formada por acúmulos de leucocitos degenerados de aspecto fusiforme, identificados como macrófagos y neutrófilos, que llenan las luces alveolares. Las lesiones en vías aéreas de conducción se manifiestan en forma de exudados bronquiolares compuestos por células epiteliales, células inflamatorias degeneradas y fibrina [Formas clínicas y lesiones, (sin año de publicación)]. La pleuritis en el periodo agudo es serofibrinosa con linfangiectasias en el parénquima subyacente [Gottschalk M, 2012].

Si el proceso evoluciona hacia la cronicidad tiene lugar la proliferación de tejido de granulación alrededor de las zonas de necrosis, que resultan posteriormente limitadas por una cápsula de tejido conectivo [Formas clínicas y lesiones, (sin año de publicación)]. Estas lesiones contienen un elevado número de microorganismos, lo que determina un estado de animales portadores crónicos, pudiendo tener lugar una exacerbación de los síntomas y la



aparición de complicaciones debidas a la intervención de otros microorganismos oportunistas. En esta fase aparecen exudados purulentos en bronquios y bronquiolos y si no se produce la reabsorción del exudado fibrinoso pleural, éste evoluciona hacia la fibrosis con formación de sinequias. En los ganglios linfáticos regionales se observa linfadenitis purulenta.

Una de las complicaciones más frecuentes de la pleuroneumonía porcina es la pericarditis serofibrinosa con desarrollo posterior de adherencias y engrosamiento fibroso. Aunque en la mayoría de los casos las lesiones están limitadas a la cavidad torácica, a veces se puede observar también peritonitis fibrinosa, meningoencefalitis purulenta, endocarditis ulcerosa, artritis y osteomielitis [Formas clínicas y lesiones, (sin año de publicación)].

5.13 Diagnósticos de Laboratorio

El diagnóstico de pleuroneumonía por *Actinobacillus pleuropneumoniae* puede realizarse a través de distinta metodología:

1. El diagnóstico clínico-anatomopatológico, por observación de síntomas y lesiones típicas, se utiliza en casos agudos, subagudos y crónicos de la enfermedad, pero no es posible utilizarlo para la detección de infecciones subclínicas o asintomáticas. Sin embargo, es útil y bastante eficiente en los casos mencionados.
2. El diagnóstico bacteriológico complementa al anterior, constituyendo el diagnóstico de certeza, pero no discrimina, a menos que se utilicen técnicas moleculares modernas, al serotipo actuante en el brote o infección subclínica del animal muestreado.
3. El diagnóstico serológico es de utilidad para determinar presencia o ausencia de infección a nivel granja o portadores inaparentes, pero no es eficiente para realizar diagnósticos etiológicos en brotes agudos en granjas primoinfectadas. Por tanto, puede deducirse que de acuerdo a las necesidades y situación epidemiológica del problema en estudio deberán utilizarse en forma combinada [Zielinski, G; (2006)].

Para poder determinar la presencia de algún(os) patógeno(s) microbiano(s) se pueden emplear distintas técnicas de aislamiento utilizadas en la microbiología clásica o bien técnicas más avanzadas como son de biología molecular. El uso de pruebas serológicas es fundamental para la identificación de portadores asintomáticos, los cuales son responsables de la diseminación de la enfermedad en grupos de cerdos no infectadas. Las técnicas inmunológicas directas como inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (IHQ) representan otra opción para el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina. Estas técnicas tienen como base la identificación de antígenos, serotipo y biotipo específicos en tejidos frescos, congelados, fijados en formol o en bloques de parafina



Aislamiento bacteriano

El aislamiento de *A. pleuropneumoniae* se lleva a partir de material de lesiones (pulmón o tonsilas). Puede utilizarse hisopos, sembrando en medios selectivos y agar sangre con una estría nodriza. Luego se procede a la identificación y tipificación [Rodríguez, F. E; *et al*, 2002].

Se toma una muestra de tejido normal o con lesiones neumónicas. Las muestras son inoculadas en agar sangre con una estría de *Staphylococcus aureus* para proveer el factor V. Las placas son incubadas durante 24 h a 37°C bajo condiciones de microaerobiosis. Las colonias sospechosas son transferidas a cajas con agar tripticasa soya (TSA) suplementado con 10 g/ml de NAD y 1% de suero fetal bovino que posteriormente son incubadas durante 24 h a 37°C bajo condiciones de microaerobiosis. La identificación final de las colonias sospechosas a *App* se obtiene mediante el uso de pruebas bacteriológicas de rutina como tinción de Gram, oxidasa, catalasa, ureasa de Christensen, reacción a la prueba de CAMP, satelitismo en presencia de la cepa nodriza de *S. aureus* y dependencia de factores de crecimiento utilizando discos impregnados con factor X, V o X+V. A partir de muestras de pulmones de rastro es difícil, en comparación con aislamientos obtenidos de lesiones hiperagudas y agudas, y a que el crecimiento de la bacteria en lesiones crónicas es irregular, aun cuando se le proporcionen las condiciones necesarias para su crecimiento [Blackall, P.J; *et al*, 2002].

Histopatología.

Las muestras de pulmón para histopatología son fijadas en formalina amortiguada (pH 7.2) al 10% y procesadas con la técnica de inclusión en parafina. Se cortan secciones de 5 cm y se tiñen con hematoxilina y eosina (HE).

Inmunohistoquímica.

Es una prueba de laboratorio para la que se usan anticuerpos a fin de identificar ciertos antígenos (marcadores) en una muestra de tejido. Por lo general, los anticuerpos están unidos a una enzima o a un tinte fluorescente. La enzima o el tinte se activan cuando los anticuerpos se unen al antígeno en la muestra de tejido; de esa manera, el antígeno se puede observar al microscopio. Ayuda a distinguir entre diferentes tipos de patologías [Diccionario de cáncer. Instituto Nacional del Cáncer].



Rigoberto H, C, *et al*; (2002) Utilizaron anticuerpos policlonales, producidos por conejos, contra células completas de *A. pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1, como anticuerpo primario a una dilución de 1:1500 y como anticuerpo secundario se utilizó una anti-IgG de conejo biotinilada. Los antígenos o restos antigénicos de *App* fueron identificados de color café oscuro, utilizando el cromógeno diaminobencidina (DAB). Posteriormente, las muestras fueron teñidas con hematoxilina de Harris como colorante de contraste. Se usaron secciones de tejido pulmonar de cerdos inoculados experimentalmente con *App* biotipo 1, serotipo 1, y de cerdos sanos libres de *App* como testigos positivo y negativo, respectivamente. Para evaluar la especificidad del antisuero se confrontaron los frotis bacterianos de *Pasteurella multocida* serotipos A y D, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* y *A. pleuropneumoniae* serotipos 1, 5, 9 y 11 con el anticuerpo policlonal de *App* serotipo 1 [Rigoberto H, C; *et al*, 2002].

Pruebas de coagulación

La prueba de coagulación se usa de forma rutinaria, pero se producen muchas reacciones cruzadas entre serotipos debido a epítomos comunes y se debe utilizar una prueba confirmatoria, como la difusión con gel de agar y la hemaglutinación indirecta. En algunos casos particulares, las reacciones cruzadas son tan fuertes que algunos aislados se clasificarán como "serotipo 6/8" [Turni, C; *et al*, 2014].

Fijación del complemento

Al principio fue utilizada como un método de detección de especie y posteriormente se empleó como una prueba de detección específica del serotipo. Los antígenos se preparan por sonicación de una suspensión de bacterias, tomando el sobrenadante. Además, se requiere la presencia de complemento, que es suero fetal bovino y el suero problema. La fijación del complemento es más específica que la hemaglutinación indirecta, porque es capaz de distinguir entre *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Haemophilus parasuis* pero su validez para el serotipado es cuestionada ya que la frecuencia de falsos negativos es alta. La realización de esta prueba es un proceso laborioso y complejo, que requiere un elevado grado de estandarización para su éxito y con inconvenientes técnicos que lo complican [Diagnóstico de Laboratorio, (Sin año)].

Anticuerpos monoclonales

Se ha informado también el uso de anticuerpos monoclonales para el serotipado. Los anticuerpos monoclonales, especialmente los dirigidos contra los epítomos capsulares,



pueden ser diferenciados fácilmente, por ejemplo, el serotipo 1 de los serotipos 9 y 11, y el serotipo 7 del serotipo 4. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales contra el LPS reaccionarán cruzadamente entre serotipos debido al intercambio de LPS común entre algunos serotipos. Algunos de estos anticuerpos monoclonales incluso mostraron que los epítomos de LPS son comunes entre *App* serotipo 7 [Gottschalk M; 2012].

Aglutinación y coaglutinación

Son métodos simples, rápidos (aglutinación y coaglutinación) o lentos (aglutinación), para la identificación y serotipado de cepas de *A. pleuropneumoniae*. Existen tres variantes útiles de la aglutinación: la reacción lenta en tubo, la aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol (2-ME), y la rápida en porta. Con el antisuero se practican diluciones seriadas, que se mezclan con el antígeno a partes iguales y el resultado de la aglutinación se determina por inspección visual. A diferencia de otros sistemas, la aglutinación rápida evita muchas reacciones cruzadas, aunque posee el inconveniente de que no permite la clasificación de serotipos rugosos, que son autoaglutinantes, especialmente el 3 y 6 y, en ocasiones, 1 y 5, inconveniente que se salva mediante la coaglutinación que tampoco es completamente válido, porque no diferencia el serotipo 3 de los serotipos 6 y 8 [Diagnóstico de Laboratorio, (Sin año)].

Serología y tipificación

La serotipificación es el método comúnmente utilizado y se basa en la determinación del tipo de antígenos capsulares presentes en cada aislamiento, que permite su agrupación en serotipos, utilizando para ello anticuerpos específicos policlonales o monoclonales. Los inconvenientes del serotipado tradicional incluyen la presencia de reacciones cruzadas y de cepas no tipables. Se han descrito un sinnúmero de reacciones cruzadas, que dificultan una buena conclusión del serotipo, aunque son especialmente importantes las debidas al carácter inmunodominante del LPS y que hacen reaccionar a los serotipos 1, 9 y 11, el 4 con el 7 y, finalmente, el 3, 6 y 8; otras reacciones se deben a la contaminación del reactivo diagnóstico con antígenos de origen citoplasmático, debido a una manipulación o procesado inadecuados [Diagnóstico de Laboratorio, (Sin año)].

ELISA

Respecto a la prueba de ELISA, el que se usa con mayor frecuencia es aquel que detecta anticuerpos contra la toxina Apx IV. Esta toxina (precisamente) sólo es producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, al estar viva en el animal y no por otra especie bacteriana.



Este kit, no diferencia entre los serotipos, muchas granjas están infectadas por varios serotipos de *App*, la mayoría de los cuales no son patógenos, por lo que estas granjas darán resultados positivos y no se podrá diferenciar de otra granja que este infectada con un serotipo gravemente patógeno. Los cerdos que se vacunan con bacterinas o vacunas a base de toxinas, no presentan ninguna reacción serológica, lo que permite la diferenciación de animales vacunados de aquellos infectados [Dreyfus, A; *et al*, 2004].

Detección directa.

Los métodos convencionales de aislamiento e identificación necesitan, al menos, de 3-4 días, por lo que los procedimientos que identifican el agente directamente en muestras clínicas son de inestimable ayuda, al acortar el tiempo necesario para la puesta en marcha de las medidas de control más adecuadas. Se incluyen, entre otros, la coagulación, técnicas inmunohistoquímicas o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Diagnóstico de Laboratorio, (Sin año)].

Detección indirecta.

Se han utilizado diversos procedimientos para la identificación de anticuerpos en animales infectados, como la aglutinación en tubo con 2-ME, la hemaglutinación indirecta, el inmunoblotting, el radioinmunoensayo, la fijación del complemento, el ELISA y la neutralización de la hemolisina Apx 1 [Diagnóstico de Laboratorio, (Sin año)].

Nota: Estas son sólo algunas pruebas que se utilizan de forma convencional para la identificación, es claro que existen un mayor número de pruebas, sólo que las aquí mencionadas se utilizan con una mayor frecuencia; con el paso del tiempo y los avances en la investigación es posible que lleguen a quedar obsoletas.

6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Un método similar al inmunológico, aunque basado en la detección de material genético (en este caso de las bacterias) es el uso de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, ya que ésta técnica detecta la presencia de material genético en cantidades muy bajas (como puede ser de algún patógeno para este caso).



En los últimos años se han publicado alternativas al serotipado convencional, se han desarrollado ensayos de PCR que detectan los genes asociados con lipopolisacáridos capsulares para identificar algunos serotipos de *A. pleuropneumoniae*, ya que se sabe que estos polisacáridos son el antígeno primario específico de serotipo [Turni, C; *et al*, 2014]. Es precisamente en este aspecto, que el reciente desarrollo de la PCR ha venido a enriquecer la práctica diagnóstica molecular de las enfermedades infecciosas en los laboratorios de todo el mundo; una vez recolectada y preparada la muestra, ocurre en su seno la rápida multiplicación (amplificación) del DNA perteneciente al agente causal, y las millones de copias obtenidas incrementan notablemente la sensibilidad de cualquier técnica que se elija, para, posteriormente, lograr la detección correspondiente [Garza, V.R; *et al*, (Sin año de publicación)].

La gran complejidad de los procesos biológicos en los seres vivos ha sido por años la razón por la que los investigadores han centrado su atención en descifrar los mecanismos que se esconden detrás de esos procesos. Desde las primeras observaciones de Gregorio Mendel hasta la actualidad, se tiene la noción de que parte de la explicación de los diferentes fenómenos biológicos se encuentra escondida en lo más recóndito del genoma celular y que una de las claves para entender dichos fenómenos es el estudio de los genes. Uno de los descubrimientos más importantes de la historia que marcó el inicio de una nueva era en el estudio y conocimiento de los ácidos nucleicos (creando múltiples copias de un fragmento de genoma) fue el de Watson y Crick, al descifrar la estructura del DNA. Desde entonces, varios grupos han mostrado un gran interés por desarrollar métodos sensibles y reproducibles que les permitan estandarizar protocolos experimentales para estudiar los ácidos nucleicos. Es así como han ido apareciendo diferentes tecnologías cuyos protocolos están dirigidos al estudio del DNA; probablemente, la más importante sea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada por Kary Mullis en 1983, y que revolucionó la biología molecular y la forma en cómo se estudiaban los ácidos nucleicos en ese momento. Esta técnica es considerada la más revolucionaria del último cuarto del siglo XX. En el libro “*Making PCR: a story of biotechnology*”, Paul Rabinow cuenta en detalle los acontecimientos históricos que dieron lugar a la invención de la técnica. Las primeras técnicas genéticas utilizadas en el diagnóstico microbiológico se basaban en hibridación con sondas de DNA; aunque son de elevada especificidad, en general su sensibilidad no es adecuada, se utiliza para microorganismos de lento crecimiento o de difícil aislamiento y para aquellos procesos que por su gravedad puedan beneficiarse especialmente de un diagnóstico rápido [Cortazar M, A; *et al*, 2004; Hernández H, F, C; *et al*, 2009; PCR: reacción en cadena de la polimerasa. (Sin número); Rodríguez, S. I.P; *et al*, 2004; Tamay de Dios L; *et al*, 2013].

Actualmente sabemos que la misión de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de DNA blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como DNA polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de DNA pueden ser



sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines. El desarrollo de esta técnica permitió estudiar y manipular mejor al DNA, facilitando el establecimiento de protocolos experimentales en biología molecular [Tamay de Dios L; *et al*, 2013]. En principio para practicarla bastaría una sola molécula, por ejemplo, del genoma humano (~6 picogramos), aunque habitualmente se emplean cantidades excesivas de éste (en el orden de hasta microgramos). Además, por si estos atributos fueran pocos, la técnica es tan robusta que puede usar como substrato para la reacción al DNA, sin tener que purificarlo de su fuente natural, por lo que, casi cualquier tipo de muestra puede ser utilizada para la realización de esta técnica, la cual detecta (como ya se ha mencionado) el material genético (puede ser el patógeno en cuestión; estando el microorganismo vivo o inactivado), lo que nos da una elevada sensibilidad; y por ello se puede utilizar sangre, suero, semen, tejidos embebidos en parafina, lavados bronquiales, exudados de mucosas, raíces de cabellos o cejas, extendidos citológicos, productos biológicos, entre otros; muchas veces basta una simple ebullición de la muestra para lisar, liberar y de paso desnaturalizar el DNA, dejándolo listo para la reacción [PCR: reacción en cadena de la polimerasa. (Sin número)]. El progreso de esta técnica ha sido muy notable y ha ido en paralelo con los nuevos retos para estudiar y comprender mejor el rol de los genes, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [PCR: reacción en cadena de la polimerasa. (Sin número); Tamay de Dios L; *et al*, 2013; Rodríguez, S. I.P; *et al*, 2004].

6.1 Proceso de la PCR

La exactitud y precisión del diagnóstico molecular se fundamentan en dos factores generales:

- 1) La gran consistencia de la secuencia nucleotídica en los segmentos “blanco” de DNA
- 2) La posibilidad de establecer en forma rápida, confiable, y actualmente, con mayor sensibilidad la procedencia de los ácidos nucleicos (ya que estos presentan segmentos específicos para cada género, especie, tipo y cepa microbianos). La PCR es relativamente fácil de llevar a cabo, ya que sólo requiere de un tubo de reacción, de algunos reactivos y de una fuente estable de calor. Adicionalmente, el DNA que se desea copiar puede encontrarse puro o constituir una pequeña porción de una mezcla compleja de materiales biológicos [Garza, V.R; *et al*, (Sin año de publicación)].

Cabe señalar que la amplificación de DNA por PCR requiere que exista al menos una molécula intacta del DNA "blanco"; no obstante, cifras mayores aumentan la probabilidad de que el proceso resulte exitoso. La cantidad total de DNA "blanco" utilizado en el PCR es realmente pequeño: de 0.05 a 1.0µg, rango que asegura la detección de una copia única de la secuencia "blanco" presente en la muestra. Adicionalmente, si la muestra no se encuentre altamente purificada (si bien algunas impurezas tales como formaldehído, ácido húmico, agentes quelantes, detergentes y metales pesados pueden impedir la amplificación del DNA



"blanco"); bajo tales condiciones resulta conveniente intentar la eliminación de dichos elementos o, por lo menos, su dilución. En caso necesario, el DNA se puede purificar mediante el tratamiento con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, o bien, por la técnica de extracción salina y precipitación con etanol [Garza, V.R; *et al*, (Sin año de publicación)].

La PCR es un procedimiento muy sensible que utiliza una polimerasa de DNA, en un principio, la DNA polimerasa de la bacteria *Escherichia coli* (pero esta enzima resulta desactivada debido a la alta temperatura requerida para desnaturalizar la doble cadena del DNA, por lo cual debía agregarse enzima fresca al comenzar el tercer paso de cada ciclo) [Cortazar M. A; *et al*, 2004]; este procedimiento permite amplificar y detectar de manera específica, a partir de una sola molécula blanco, secuencias particulares de DNA. La reacción depende de oligonucleótidos cortos (cebadores o sondas) que tienen la secuencia adecuada (complementaria) para hibridar en los extremos de cadenas sencillas del DNA blanco, las cuales se obtienen mediante la desnaturalización del DNA original. Una vez unida, la sonda sirve como ancla para que la polimerasa inicie la producción de la cadena complementaria a la secuencia blanco, de tal manera que se forman moléculas de DNA de doble cadena. La desnaturalización de este DNA, la hibridación con la sonda y la síntesis de la cadena complementaria con ciclos repetidos permiten la obtención de grandes cantidades de DNA específico del microorganismo investigado, lo cual facilita su detección [Hernández H, F, C; *et al*, 2009].

Para llevar a cabo la PCR se requiere de un aparato llamado termociclador, la primera máquina termocicladora, "Mr. Cycle" fue creada por los ingenieros de Cetus para tratar esa necesidad de agregar la enzima fresca a cada tubo de prueba después del calentamiento y del proceso de enfriamiento. Sin embargo, este inconveniente fue solucionado de manera ingeniosa cuando se la reemplazó por su equivalente de la bacteria "termófila" *Thermus aquaticus*. En efecto, la DNA polimerasa de este microorganismo, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75°C y los 80°C y resiste más de dos horas a 93°C. La purificación de la polimerasa de Taq dio lugar a la necesidad de una máquina que realizara un ciclo más rápidamente entre diversas temperaturas. En 1985, Cetus se asoció con la corporación Perkin-Elmer e introdujo la DNA Termal Cyler. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados [Cortazar M. A; *et al*, 2004].

La especificidad de la prueba se obtiene a partir de la utilización de secuencias complementarias a la específica del agente infeccioso (para este caso). En una reacción normal de PCR se utilizan los siguientes productos: DNA-Polimerasa termoestable (por ejemplo, Taq polimerasa); un par de "primers" específicos para el agente infeccioso (primer



forward y primer reverse); mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs: dATP; dTTP; dCTP; dGTP); tampón de la polimerasa y el DNA molde. La variabilidad de la muestra, que sirve de base para la PCR, es inmensa desde muestras de heces a muestras de tejidos. Aunque algunos autores hacen referencia a los inhibidores de la PCR, que reducen la eficacia del ensayo, hoy en día es perfectamente posible a través de las técnicas de extracción. La PCR es una técnica rápida, sensible, específica y fiable para la detección de agentes patógenos. La sensibilidad y especificidad de la PCR también varían de acuerdo con la preparación de la muestra, siendo bastante comunes contaminaciones [Oliveira, C, 2011].

Una reacción de PCR consiste en una serie de ciclos, cada uno de los cuales implica reacciones a temperaturas diferentes. Cada ciclo de PCR está constituido por tres fases distintas: desnaturalización del DNA molde (a 94°C), emparejamiento, empalme o alineamiento de los “cebadores” (40 a 72°C) y la síntesis o extensión del DNA (a 72°C). La desnaturalización consiste en la separación de las cadenas de la doble hélice de DNA a través del calor. Esta separación es esencial para que en la segunda fase los dos “primers” se unan a las secuencias de los pares de bases complementarias de la cadena molde. La temperatura de esta fase varía, dependiendo de la composición del primer y de su complementariedad con el DNA objetivo. Los “primers” sirven, por lo tanto, de punto de partida para la replicación de DNA y para la extensión. La enzima responsable de esta polimerización es la DNA polimerasa termoestable. Así, dos nuevas cadenas se sintetizan a partir de la cadena molde en cada ciclo completo de PCR, luego ocurre un crecimiento exponencial, habiendo al final de n ciclos dos veces más copias que en el inicio [Oliveira, C, 2011].

El reconocimiento del material producido se obtiene mediante electroforesis en geles de agarosa y la identificación de bandas del tamaño molecular esperado por medio de tinción con bromuro de etidio. La sensibilidad y especificidad de la PCR han permitido el desarrollo de métodos diagnósticos para una gran variedad de agentes infecciosos: bacterias, protozoarios, virus y helmintos. La prueba de PCR descrita y que se trabajó en este proyecto se conoce como de “punto final”, ya que la reacción se detiene hasta que todos los reactivos necesarios para la amplificación se han utilizado [Hernández H, F, C; *et al*, 2009].

En el gel de agarosa existen diferentes “carriles” de corrimiento. En forma normal se utiliza uno de estos carriles de los extremos para colocar un control o marcador de pares de bases conocido, normalmente de 0 a 600 pares de bases (bp), con incrementos de 100 bp, seguido se coloca un control positivo y negativo, ambos productos del PCR y en los carriles restantes se coloca el producto del PCR obtenido de las muestras problema. Al aplicar la corriente eléctrica los fragmentos de DNA tienden a migrar. Posteriormente el gel es teñido con bromuro de etidio (o algún colorante fluorescente) que solo se adhiere al DNA presente en la agarosa del gel. El gel es visualizado con una lámpara de luz ultravioleta y se escanea o se fotografía para dejar una evidencia física del corrimiento electroforético. Con la fotografía



imagen escaneada del gel se determina el tamaño de los fragmentos amplificados del producto del PCR, comparándolo contra el control de pares de bases y el control positivo [Lara, J., *et al*, 2006].

En resumen. La Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una prueba que se utiliza para amplificar una porción específica del material genético del microorganismo (ácido nucleico). Se extrae el ácido nucleico específico de la muestra (tejido) y se elimina el exceso de proteínas y de sustancias inhibitorias. El DNA es la muestra para iniciar la PCR, por ello las bacterias y virus DNA pueden ser utilizados directamente para la prueba. En el caso del material genético conformado por ácido ribonucleico (RNA), se debe de convertir de RNA en DNA, utilizando una enzima conocida como retrotranscriptasa o transcriptasa inversa, con ello se crea un DNAc (ácido desoxirribonucleico complementario), para poder utilizar así una secuencia blanco adecuada para la prueba (Extracción y purificación de DNA).

6.2 Etapas básicas de la amplificación (PCR de punto final)

Tres son los pasos a seguir y a repetir por cada ciclo de la PCR. A éstos comúnmente se les refiere como desnaturalización, alineamiento o alineación y extensión (elongación o prolongación). Si de trabajar con DNA genómico se trata, regularmente se agrega una etapa previa de desnaturalización a 94°C, para relajar las posibles estructuras secundarias y de otros tipos. Después de concluida ésta, se repiten los diferentes ciclos en los que tanto la temperatura como el tiempo serán específicos del producto a amplificar y del origen del ácido nucleico que servirá, como ya se mencionó, de plantilla o molde a copiar por la polimerasa utilizada [Rodríguez, S. I.P; *et al*, 2004].

1. **Desnaturalización:** El sustrato de la enzima de la PCR es el DNA de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria. Mediante un calentamiento a 94°C, el DNA de doble cadena logra que sus cadenas se separen o desnaturalicen (figura 3).

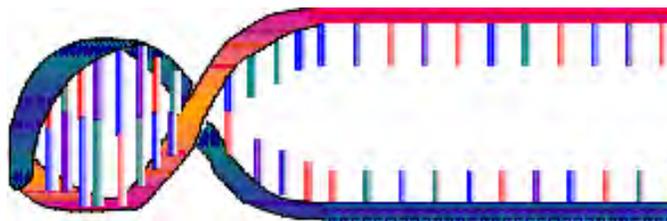


Figura 8. Desnaturalización del DNA. Los puentes se rompen dejando al DNA en forma de cadena sencilla, permitiendo así exponer las diferentes bases nitrogenadas para la hibridación con los oligonucleótidos cebadores.



Ésta es una etapa crítica, ya que es muy importante que el DNA molde se desnaturalice completamente, lo que se consigue a temperaturas de 94°C, durante por lo menos un minuto. Si la muestra tiene alto contenido de G+C, se recomienda aumentar de preferencia el tiempo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C (vida media a 92.5°C = 2h, a 95°C = 40 min. y a 97.5°C = 5 min.), por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. En la práctica se suele empezar con un período de desnaturalización prolongado (cinco minutos a 94°C), para asegurarse que la desnaturalización se lleve a cabo a lo largo de toda la molécula del DNA [Rodríguez, S. I.P; *et al*, 2004].

2. **Alineamiento:** La enzima, como todas las DNA polimerasas, necesita del grupo OH-libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde iniciar la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde. Mientras que un cebador (referido como el 5' o sentido) es complementario a la secuencia del extremo 5' de la región del DNA molde a amplificar, el otro es al extremo 3' de la misma, pero en la cadena opuesta (figura 3). El alineamiento específico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72°C. Ambas cadenas originales del DNA sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas. Un aumento de temperatura favorece la especificidad, ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con sitios apócrifos del DNA molde [Rodríguez, S. I.P; *et al*, 2004].

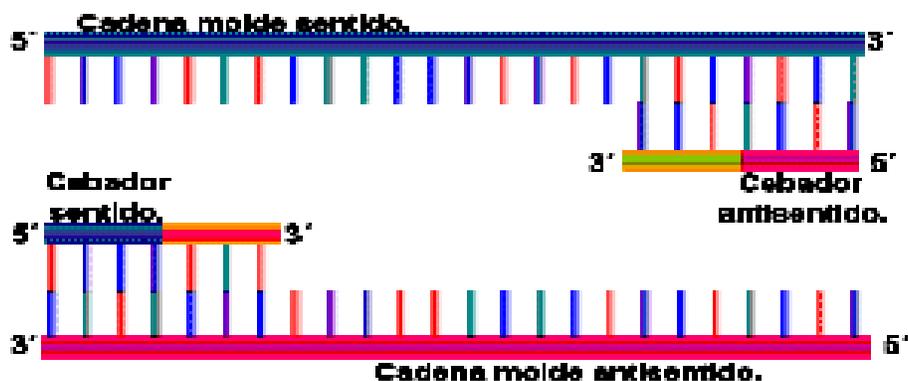


Figura 9. Inicio de la reacción de la PCR. Los cebadores complementarios que flanquean el sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno. De esta manera la polimerasa puede comenzar a extenderlos para copiar ambas hebras molde.



3. **Extensión:** Con el DNA molde de cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleósidos monofosfatos en dirección 5' → 3' (figura 4). Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72°C) para evitar alineamientos inespecíficos de los iniciadores. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min. para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar todos los ciclos se realice un último alargamiento por 5 min. a 72°C, para asegurarse que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan, por ende, exactamente la misma longitud [Rodríguez, S. I.P; *et al*, 2004].

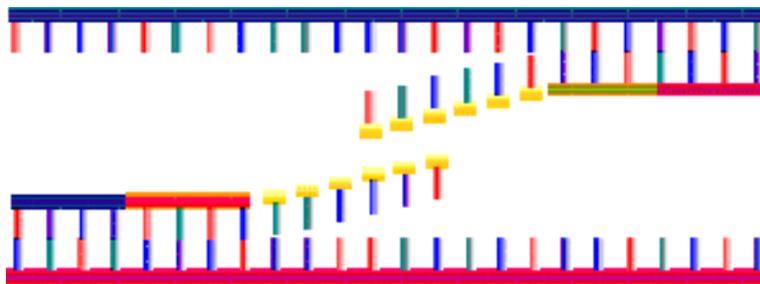


Figura 10. Progreso de la reacción de la PCR. A la temperatura óptima de la DNA Polimerasa Taq (72°C), la enzima agrega los dNTPs a partir del 5' hacia el extremo 3'.

6.3 Ventajas y desventajas de la PCR

Durante los últimos años ha habido un aumento en las técnicas de diagnóstico basadas en el uso de PCR y por tal motivo existen más variaciones de dicha técnica, ésta prueba tiene la capacidad de amplificar rápidamente una cadena de DNA, además de ser una técnica muy sensible y específica, la región que se está amplificando ofrece ventajas sobre las técnicas de diagnóstico tradicionales puesto que el microorganismo que se detecta no necesita ser cultivado previamente o estar vivo, debido a que solamente se requiere la presencia de DNA.

Una serie de factores pueden tener un impacto significativo en la eficiencia y especificidad de la PCR, incluyen: el diseño de “primers”, los parámetros de PCR (número de ciclos, tiempos y temperaturas de los ciclos) y la composición de la mezcla de PCR. El diseño cuidadoso de los “primers” es necesario para obtener los productos deseados en gran cantidad, para suprimir la amplificación de secuencias no requeridas y para facilitar la consecuente manipulación de los productos amplificados. Una vez que la reacción de PCR es capaz de amplificar millones de veces una sola molécula de DNA, se deben tomar



precauciones para evitar las contaminaciones de la muestra con DNA exógeno. En la mayoría de las aplicaciones de PCR, el parámetro más crítico es la temperatura de emparejamiento de los “oligonucleotidos” utilizados [Oliveira, C, 2011].

Si la temperatura es muy alta, muy próxima o superior a la T_m (temperatura de fusión o de melting) de los oligonucleotidos, estos se ligan mal o no se conectan y la amplificación es muy baja o inexistente. Si la temperatura es muy baja, puede ocurrir una conexión inespecífica de los cebadores, resultando en la amplificación de fragmentos no deseados. Se puede mejorar la especificidad del PCR alterando la temperatura de hibridación de los “primers” en gradientes controlados de temperatura (cambios sucesivos de 0,5-1°C). La temperatura máxima de emparejamiento es determinada por la T_m del primer. Además de la temperatura de emparejamiento, también el magnesio (Mg^{2+}) influye en el rendimiento de la PCR. Todas las DNA polimerasas termoestáticas requieren para su actividad cationes divalentes libres (por ejemplo, Mg^{2+}). El exceso de este compuesto lleva al aumento de conexiones inespecíficas de los oligonucleotidos, resultando en la amplificación de fragmentos no pretendidos. Por otro lado, la baja concentración de Mg^{2+} está asociada a débiles amplificaciones o incluso inexistentes. La concentración óptima de Mg^{2+} debe determinarse empíricamente para cada combinación de “primers” y cadena de ADN, ya que depende de estos dos agentes [Oliveira, C, 2011].

Esta técnica de diagnóstico es más sensible que la serología, ya que se ha demostrado que cerdos vacunados con una vacuna de subunidades conteniendo las toxinas Apx I, Apx II y Apx III resultan negativos a la técnica de ELISA [Dreyfus, A; *et al*, 2004]. Por lo tanto, en el cuadro número 4, se mencionan las principales ventajas y desventajas que ocurren al momento de llevar a cabo la técnica de PCR.

Cuadro número 4. Ventajas y desventajas de la PCR [Programa de Formación del Profesorado UNED, 2000].

Principales ventajas de la reacción	Principales desventajas de la reacción
<p>I. Rapidez y sencillez de uso.</p> <p>La PCR permite clonar DNA en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Una reacción de PCR típica consiste en 30 ciclos de desnaturalización, síntesis y reasociación. Cada ciclo dura típicamente de 3 a 5</p>	<p>I. Necesidad de disponer de información sobre la secuencia del DNA diana</p> <p>Para poder construir oligonucleótidos específicos que actúen como cebadores para la amplificación selectiva de una secuencia particular de DNA se necesita disponer de alguna información previa sobre la propia</p>



<p>minutos y se utiliza un termociclador que lleva un microprocesador para programar los cambios de temperaturas y el número de ciclos deseado. Esto supera ampliamente el tiempo requerido para la clonación en células, que suele ser de semanas, o incluso meses. Por supuesto, el diseño y síntesis de los oligonucleótidos cebadores también lleva tiempo, pero este proceso ha sido simplificado gracias a la aparición de programas informáticos para el diseño de los cebadores, y a la proliferación de casas comerciales especializadas en la síntesis de oligonucleótidos por encargo. Una vez que se pone a punto, la reacción puede ser repetida de forma sencilla.</p>	<p>secuencia a amplificar. Esto implica, por regla general, que la región de interés ya haya sido parcialmente caracterizada, a menudo mediante la aplicación de métodos de clonación basados en sistemas celulares. Sin embargo, y para casos concretos, se han desarrollado varias técnicas que reducen o incluso hacen desaparecer esta necesidad de disponer de información previa sobre la secuencia del DNA diana.</p>
<p style="text-align: center;">II. Sensibilidad.</p> <p>La PCR puede amplificar secuencias a partir de cantidades ínfimas de DNA diana, incluso a partir de DNA contenido en una sola célula. Esta elevada sensibilidad ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para el estudio de la patogénesis molecular y la aparición de numerosas aplicaciones (ciencia forense, diagnóstico, estudios de paleontología molecular, ente otros) donde las muestras pueden contener muy pocas células. Sin embargo, el hecho de que el método tenga una sensibilidad tan elevada significa también que se deben extremar las precauciones para evitar la contaminación de la muestra con DNA extraño.</p>	<p style="text-align: center;">II. Tamaño corto de los productos de la PCR</p> <p>Una desventaja clara de la PCR como método de clonación de DNA ha sido el tamaño de las secuencias de DNA que permite clonar. A diferencia de la clonación de DNA en células, donde pueden clonarse secuencias de hasta 2 Mb, la información de que se dispone sobre la mayor parte de secuencias clonadas por PCR sitúa el tamaño de los fragmentos clonados entre 0 y 5 Kb, tendiendo hacia el extremo inferior. Los fragmentos pequeños se amplifican muy fácilmente, pero conforme aumenta su tamaño se hace más difícil obtener una amplificación eficiente. En la actualidad sin embargo ya es posible amplificar secuencias por PCR de tamaños entre 20 y 40 Kb.</p>
<p style="text-align: center;">III. Robustez.</p>	<p style="text-align: center;">III. Infidelidad en la replicación del DNA</p>



<p>La PCR permite la amplificación de secuencias específicas de material que contiene DNA muy degradado, o incluido en un medio que hace problemática su purificación convencional. Esto hace que el método resulte muy adecuado para estudios de antropología y paleontología molecular, por ejemplo, para el análisis de DNA recuperado de individuos momificados y para intentar identificar DNA de muestras fósiles que contienen poquísimas células de criaturas extintas hace ya mucho tiempo. El método se ha empleado con éxito también para la amplificación de DNA de muestras de tejidos fijadas con formol, lo cual ha tenido importantes aplicaciones en patología molecular.</p>	<p>La clonación del DNA en células pasa por la replicación del DNA <i>in vivo</i>, proceso asociado a una gran fidelidad de copiado debido a la existencia, en la célula, de mecanismos de lectura y corrección de errores. Sin embargo, cuando el DNA se replica <i>in vitro</i> la tasa de errores cometidos durante el copiado se dispara. Ya se ha comentado anteriormente que la Taq polimerasa utilizada en la reacción no tiene actividad exonucleásica.</p>
	<p>IV. Peligro de contaminación</p> <p>La facilidad con que se amplifica el DNA exige evitar el peligro de contaminación inherente al poder multiplicador de la reacción. En un tubo en el que se ha realizado una reacción de PCR hay tal cantidad de DNA, que al salir caliente del termociclador y abrir este, el vapor alcanza el ambiente del laboratorio. "Si se pasa un papel de filtro por los pomos de las puertas, o la superficie del termociclador, se puede rescatar suficiente DNA como para obtener una señal".</p>

Como se muestra en el cuadro número 4, a pesar de las ventajas de sensibilidad, velocidad y especificidad, existen algunos factores que pueden afectar significativamente a la técnica de PCR. Desde el inicio de la utilización de la PCR en el diagnóstico de enfermedades, un problema para los laboratorios ha sido la elevada sensibilidad de la reacción. Esta



sensibilidad a menudo lleva a falsos positivos. Normalmente, la causa de falsos positivos es la contaminación de las reacciones de prueba de PCR con productos de reacciones anteriores. Actualmente, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico utilizan protocolos para minimizar la posibilidad de contaminación. Estos incluyen separar físicamente las áreas donde se preparan las reacciones e incluir controles negativos en el análisis (por ejemplo, agua) [Oliveira, C, 2011].

Justificación:

Los signos clínicos de la enfermedad varían con la edad del animal, su estado inmunitario, las condiciones ambientales, el grado de exposición al agente infeccioso, por lo que el curso clínico de la enfermedad puede adoptar tres formas distintas: hiperaguda, aguda o crónica. El cuadro hiperagudo y agudo es típico de explotaciones libres del agente mientras que el cuadro crónico está más relacionado con áreas donde la enfermedad presenta carácter endémico. Por lo general afecta a los cerdos entre las 8-18 semanas de vida. Tanto la morbilidad como la mortalidad pueden ser exacerbadas por la presencia de patologías como la enfermedad de Aujeszky y PRRS. Se considera, por regla general, que la incidencia de la pleuroneumonía porcina está ligada a variación estacional siendo normal observar expresiones clínicas en épocas frías del año. No obstante, existen autores que consideran que la incidencia de la enfermedad se mantiene a lo largo de todo el año. Una de las razones por las que las infecciones por este microorganismo sean subdiagnosticadas se debe a las enormes variaciones entre las distintas cepas y serotipos de *App*, por tal motivo no siempre es posible identificar correctamente a este agente etiológico mediante los métodos comunes de diagnóstico [Dreyfus, A; *et al*, 2004]. Existen diferentes técnicas de diagnóstico para demostrar la infección por *App*; uno de ellos es la PCR, que puede realizarse a partir de aislados bacterianos o directamente de tejidos. Cuando los cerdos han sido tratados con antibióticos y no es posible aislar la bacteria, se usa la PCR como herramienta alternativa para la detección, ya que son una buena e infalible opción para llevar a cabo un diagnóstico certero y confiable de este microorganismo ya que, por su alta sensibilidad, puede amplificar secuencias a partir de cantidades ínfimas de DNA diana, incluso a partir de DNA contenido en una sola célula, y por consiguiente es una excelente forma para realizar el dictamen. Por esta razón, en el presente trabajo se llevará a cabo la estandarización de oligonucleótidos específicos, así como la técnica de PCR para la identificación de *App* a partir de diferentes muestras de tejidos.



7. Objetivos

7.1 Objetivo general o principal:

Realizar la detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en muestras de tejido de cerdos provenientes de distintas granjas porcícolas de la zona del bajío de la república mexicana, llevando acabo las correctas condiciones experimentales (como son buen manejo de las muestras, preparación adecuada del material a utilizar, esterilización, entre otros) para lograr la estandarización de los oligonucleótidos específicos y posteriormente realizar la técnica de PCR de punto final para la detección de *App* y así, determinar la presencia de la bacteria en diferentes tejidos porcinos propios del estudio.

7.2 Objetivos específicos o secundarios

- Extraer al *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir de distintas muestras de tejido como son: pulmones, corazón y tonsilas; provenientes de diversas granjas porcícolas del bajío.
- Estandarizar el uso de cebadores específicos para *Actinobacillus pleuropneumoniae* en muestras de tejido.
- Utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa y la posterior electroforesis, confirmar la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en distintas muestras de tejido, para así, realizar el diagnóstico certero sobre la presencia de *App* en los cerdos.

8. Materiales y métodos (Metodología)

8.1 Lugar donde se trabajaron las muestras

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de virología del edificio de posgrado en Campo 1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

8.2 Raza de los animales

Las muestras de los cerdos trabajados en este estudio, provienen de cerdos de raza híbrida, provenientes de granjas porcícolas del bajío de la República Mexicana.



8.3 Muestreo y tamaño de la muestra

Las muestras se trasladaron en recipientes de unicel, dentro de los cuales llevaban refrigerantes, manteniendo así la integridad de las muestras hasta su posterior llegada al laboratorio de virología en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, del edificio de posgrado Campo 1; una vez llegadas las muestras a la facultad, se refrigeraron a una temperatura de -20°C ; estas muestras fueron tomadas de las granjas de forma aleatoria de cerdos con presencia de síntomas de una edad no mayor a dos años de vida y posteriormente sacrificados, fue un muestreo de distintos órganos de 30 cerdos (un órgano por cada cerdo) provenientes de granjas reportadas con problemas respiratorios. Para la toma de muestra y su posterior análisis, se realizaron en primera instancia, las condiciones debidas de esterilidad, se tomó al órgano infectado (pulmón, corazón y tonsilas) y se realizó la disección aséptica de los órganos infectados, para ello se realizó una esterilización en “cruz” (o en “x”), se tomaron: una espátula, pinzas y tijera quirúrgica punta roma y se colocaron en alcohol al 70%; se tomó la espátula, se flameo por unos segundos y se hizo presión en la zona con el daño (dos veces formando una cruz), donde se observa una coloración oscura, muy opaca en comparación con las otras partes del órgano que son de un color rojizo, notándose la presencia de la enfermedad.

Se procede a tomar las pinzas y las tijeras (de igual forma flameando unos segundos los instrumentos), se corta el lugar esterilizado por la espátula, tomando 0.5cm^2 aproximadamente de profundidad, se desecha dicho producto en su respectivo recipiente de desechos y se toma por segunda ocasión de 0.5 a 1.5cm^2 de profundidad (aproximadamente) para tomarlo como muestra, recordando tomar por duplicado. Se realizó el mismo procedimiento del lado opuesto de donde se tomó la primera muestra. Posterior a la toma, se maceró un pequeño fragmento de la muestra en maceradores tipo Tem Broek con 5 ml de PBS (“Solución amortiguadora” de fosfatos) estéril, después de que el tejido se disgregó completamente, se pasa a tubos y se congelan a -20°C . Las muestras se transportaron en tubos eppendorf estériles y se conservaron a una temperatura de -20°C . Los órganos se colocaron en una bolsa de nylon auto sellable.

8.4 Características de las granjas porcícolas

Son granjas convencionales y productoras de lechones ubicadas en la zona del bajío de la República Mexicana.

8.5 Cerdos del estudio

Se recibieron un total de 30 muestras (un órgano por cada cerdo), provenientes de distintas granjas de la zona del bajío.



8.6 Obtención y preservación de la muestra de tejido

Las muestras al ser provenientes de distintas granjas del bajío, se identificaron con nombre de la granja, número progresivo por animal y fecha de la obtención de muestra; las muestras fueron trasladadas con refrigerantes y se mantuvieron a 4°C hasta su uso en la extracción de DNA.

8.7 Técnica de PCR

La técnica del PCR de punto final se utilizó para determinar la presencia de, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, presente en distintas granjas porcícolas provenientes del bajío. Se contó con Termociclador Techne Progene FPR0G02Y, un sistema de electroforesis horizontal In Vitro Gene, fuente de poder para electroforesis CONSORT 1200V-500mA E815.

8.8 Aislamiento e Identificación de las bacterias como control positivo

En primera instancia se trabajó con diferentes cepas de serotipos de *App*, estas muestras se tomaron de la cámara criogénica utilizándose un total de 3 tubos por cada serotipo, las cuales son correspondientes a los serotipos 1, 3 y 5 y fungirán como control positivo; cabe mencionar que estas cepas ya han sido identificadas como *App* y para cerciorarse de que no hayan presentado alguna contaminación al momento de descongelarse y reactivarse, se realizó lo siguiente: Se sembraron 25µL de la muestra en Agar Infusión Cerebro Corazón (Agar BHI) con una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* con estría de Cowan, se les realizaron pruebas bioquímicas primarias y posteriormente se sembraron en medios con Agar PPLO + NAD⁺ (todos los medios fueron preparados según las especificaciones del proveedor) para identificar si las cepas no están contaminadas, nuevamente se les realizaron las pruebas bioquímicas primarias para corroborar que efectivamente era la bacteria adecuada y en caso de que presente contaminación se realizará el siguiente procedimiento:

- 1.- Su posterior aislamiento por la técnica de sembrado en dilución americana.
- 2.-Una vez teniendo el crecimiento de la bacteria (pasada 24 hrs. de incubación) se le realizaran pruebas de identificación, como son la tinción de Gram y las pruebas de catalasa y oxidasa para verificar el resultado acertado sobre el crecimiento del *App*, sin contaminación.
- 3.- Se resembrará en los medios de BHI (con estría de Cowan) y en medios PPLO + NAD, observar el satelitismo de la bacteria confirmando que el producto obtenido es realmente *App* junto con las pruebas realizadas en el paso número 2 y se procederá a tomar la muestra de esa parte para sembrar en otras cajas y su posterior uso para realizar la biomasa.



8.9 Preparación de la biomasa

Al tener la certeza de que las bacterias en las placas de Petri son *App*, se prepararon caldos nutritivos a base de PPLO + NAD⁺; se tomó un pequeño trozo de Agar PPLO + NAD⁺ (donde ya estaba la bacteria identificada) para cada placa de Petri proveniente de cada serotipo y se colocaron dentro de los diferentes matraces, dejándolos en agitación constante en la incubadora (Precision Scientific Reciprocal Shaking Bath, Model 25) a una temperatura de 37°C por 24 hrs., Pasado el tiempo de 24 hrs., se tomaron los matraces, se colocaron en condiciones óptimas de esterilidad, se colocaron tubos de plástico especiales para centrifugación (ya estériles) y se pasó el caldo en cada tubo, evitando que se fuera el agar hacia dentro del tubo, se calibró a un mismo volumen y se utilizó la centrífuga IEC DPR-6000 a 5,000 r.p.m. o 500,000 fuerzas g por 30 minutos a una temperatura de 5 a 10°C aproximadamente. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se recolectó el precipitado en tubos eppendorf estériles.

8.10 Extracción de DNA para tejidos

Se utilizó el equipo de diagnóstico (kit) Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System, como se muestra en la figura 11, para la obtención del DNA proveniente de tejidos, mediante el siguiente protocolo:

- Extraer ½ cm³ de tejido y colocarlo en un tubo eppendorf estéril.
- Agregar 250µL de CRA (solución de resuspensión de Himol), se mezcla por pipeteo o por vórtex.
- Agregar 250µL de CLA (solución de lisis celular), mezclar por inversión 4 veces sin vortexear, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Adicionar 10µL de solución de proteasa alcalina, mezclar por inversión 4 veces e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Agregar 350µL de NSB (solución neutralizadora), mezclar por inversión 4 veces.
- Centrifugar a 14,000xg en microcentrífuga por 10 min. a temperatura ambiente.
- Insertar la columna en el tubo colector y transferir el sobrenadante a la columna (±850µL) sin nada de pastilla.
 - Centrifugar a 14,000xg por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el líquido del tubo colector.
 - Colocar nuevamente la columna en el tubo colector.
- Agregar 750µL de CWA en la columna.
 - Centrifugar a 14,000xg por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir la columna a un tubo eppendorf nuevo, estéril y específicamente para PCR
- Agregar 100µL de agua libre de nucleasas.
 - Centrifugar a 14,000xg por 1 minuto a temperatura ambiente.



- Descartar la columna
- Realizar una dilución 1:10 del DNA.
- Congelar a -20°C hasta su uso.



Figura 11. Equipo de diagnóstico (kit) Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

8.11 Estandarización de los “primers”, preparación de la PCR de punto final y amplificación

Se sintetizaron una serie de Oligonucleótidos para amplificar, posteriormente se corrió PCR de punto final utilizando el kit para PCR Master Mix Promega® para 100 reacciones No. Catálogo M7502. Se realizó una mezcla bajo condiciones de esterilidad para el PCR (volumen total de mezcla $50\mu\text{L}$); $2.0\mu\text{M}$ de cloruro de magnesio, $200\mu\text{M}$ de concentración para cada desoxinucleósido trifosfato; $0.25\mu\text{M}$ de los primers APXIVA1 y APXIVA3, y de 30 a 50ng de DNA genómico templado (aislado mediante el uso de un equipo de diagnóstico (kit) Qiagen DNA Mini); $25\mu\text{L}$ del PCR master mix, $5\mu\text{L}$ ($50\mu\text{M}$) de cada oligonucleótido usado, $3\mu\text{L}$ de DNA problema a una dilución 1/10 y finalmente $12\mu\text{L}$ de agua para PCR. Se utilizó un termociclador Techne Progene FPR0G02Y a las condiciones descritas en el cuadro número 5.

CUADRO 5: Secuencia de los primers utilizados en la PCR para *Actinobacillus pleuropneumoniae* [Janine T. Bossé; *et al*, 2014; L. Zhou; *et al*, 2011]:

APXIV A-1	F	TTATCCGAACTTTGGTTTAGCC	418 pb
	R	CATATTTGATAAAAACCATCCGTC	
	Condiciones	1 ciclo de 40°C por 2 min; 1 ciclo de 95°C por 15 minutos para la desnaturalización; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, y 72°C por 1 min. 30s para la alineación; y 1 ciclo de 72°C por 7 min. para la extensión.	
APXIV A-3	F	TTATCCGAACTTTGGTTTAGCC	417 pb
	R	CATATTTGATAAAAACCATCCGTC	
	Condiciones	1 ciclo de 40°C por 2 min; 1 ciclo de 95°C por 15 minutos para la desnaturalización; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, y 72°C por 1 min. 30s para la alineación; y 1 ciclo de 72°C por 7 min. para la extensión	

F: forward; R: reverse; Pb: Pares de bases (tamaño molecular)

Los productos de amplificación obtenidos se corrieron en geles de agarosa al 1.5% preparados con TAE 1X, y se utilizó un marcador de peso molecular HyperLadder® 100bp, mezclado con una solución amortiguadora de carga en un sistema de electroforesis horizontal (In Vitro Gene). Se ajustó la corrida electroforética de 110 – 115V durante 50 minutos. Los geles se revelaron en un transiluminador para analizar las bandas obtenidas. Tanto el DNA obtenido de la extracción como los productos de PCR se guardaron en un equipo REVC0® a una temperatura de -20°C. Esperando obtener un tamaño de producto de 417-418 pb.



9. Resultados

Se aisló *App* de las muestras con pleuroneumonía porcina y se confirmó la identidad de la bacteria mediante su caracterización bioquímica y su pureza por tinción Gram. Los pulmones considerados con lesiones crónicas fueron aquellos que presentaban daño necrótico bilateral (Fig. 12 y 13) (Ajito, *et al.*, 1996; Baarsch, *et al.*, 1995). Los pulmones presentan regiones macroscópicas de inflamación, hemorragia y necrosis de tamaño variable. La respuesta inflamatoria pulmonar se caracteriza por hemorragias, infiltración neutrofílica y exudado fibrinoso, en las primeras etapas de la infección. En etapas posteriores se observa tanta infiltración por macrófagos como fibrosis alrededor de las zonas de necrosis (Leidy, J. G. V, 2016).

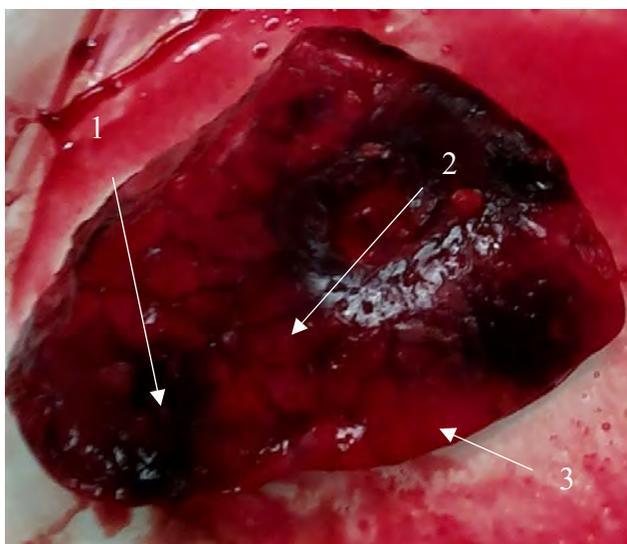


Figura 12: 1 - Área necrótica dentro de la lesión pulmonar. 2 - Zona de demarcación, área fronteriza con lesión pulmonar. 3 - Área no afectada visualmente.



Figura 13: 4 - Lugar de la toma de muestra.

Las bacterias aisladas y purificadas en los diferentes medios de cultivo, se colocaron en la incubadora a 37°C por 24 hrs, posteriormente se les realizó la tinción de Gram dando como resultado Gram negativas observándose bacilos cortos a un aumento de 100X (Fig. 14). En el agar BHI con la estría de COWAN, a tras luz, se observó el satelitismo, era evidente el crecimiento de las colonias alrededor de la cepa nodriza (Fig. 15), en el agar PPLO+NAD se observa a la bacteria ya purificada (Fig. 16).



Placas de petri:

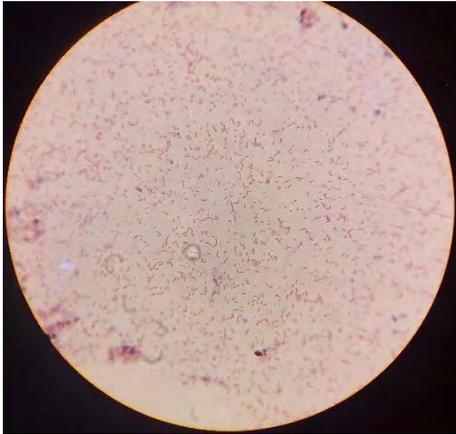


Figura 14: Las bacterias aisladas mostraron tener la forma de bacilo y fueron Gram negativas



Figura 15: 1- Se observa el satelitismo alrededor de la cepa nodriza en agar BHI



Figura 16: Se observan: 2- Las bacterias ya purificadas en el Agar PPLO con el suplemento de NAD

En el cuadro número 6, se observa las diferentes pruebas bioquímicas a las que se sujetaron las bacterias, lo cual permitió identificar correctamente *A. pleuropneumoniae*.



Cuadro 6: Pruebas de identificación realizadas:

Prueba	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. suis</i>	<i>H. parasuis</i>	<i>P. multocida</i>
Ureasa	+	+	-	-
CAMP	+	-	-	-
Catalasa	+		+	
Oxidasa	+			

En el cuadro número 6, se pueden observar las pruebas de identificación que se realizaron para corroborar que la bacteria a estudiar era efectivamente *A. pleuropneumoniae*, haciendo también una comparación con otros tipos de cepas.

Se procesaron un total de 30 muestras de diferentes tejidos, las cuales, correspondieron a distintas granjas provenientes del bajío de la República Mexicana. En la figura 17, se muestra uno de los corrimientos que se realizaron a las muestras de los serotipos ya purificados en gel de agarosa, al 1.5% mediante electroforesis, proveniente de la estandarización de los primers.

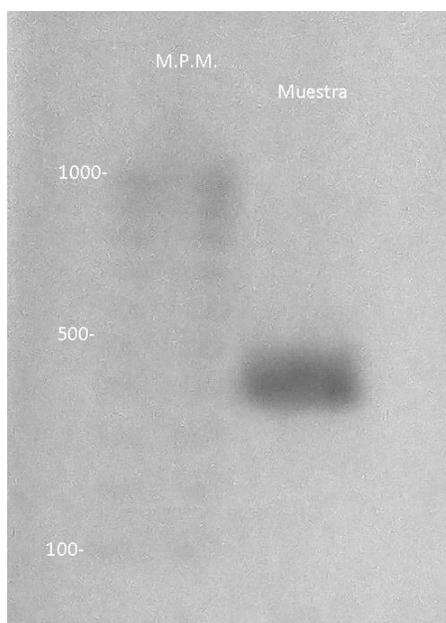


Figura 17. Prueba para el serotipo: Resultado efectivo para el control positivo de la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* proveniente de cepas purificadas a un tamaño de 418pb; se observa el marcador de peso molecular, abreviado como M.P.M. (izquierda) y la muestra positiva (derecha).



En la figura 18, se observa uno de los productos amplificados obtenidos empleando DNA de distintos aislados de *App* de una de las granjas muestreadas. La interpretación de la técnica consiste en tomar como positivas a aquellas muestras donde las bandas de DNA amplificado se acercan a la banda del marcador, a una altura de aproximadamente 417 - 418pb. La muestra del cuarto carril se puede observar como positiva a la identificación de *App*.

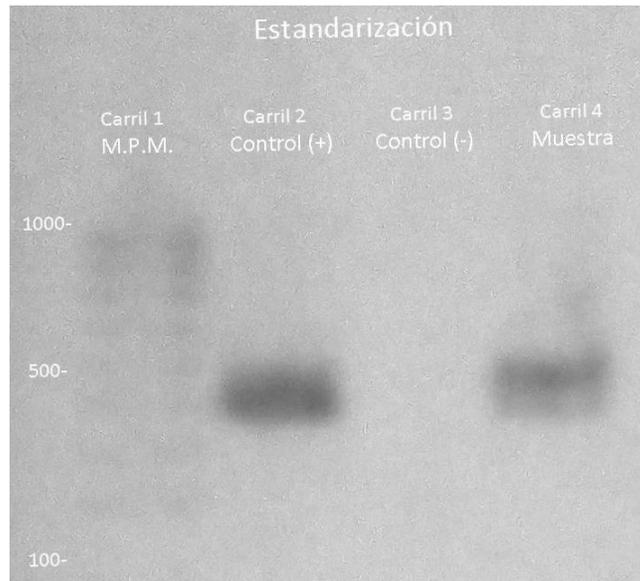


Figura 18. Prueba con el control positivo (serotipo uno) y muestra de tonsila: Se observa (de izquierda a derecha) el marcador de peso molecular (primer carril), el control positivo (segundo carril), el control negativo (tercer carril), muestra positiva (cuarto carril).

En la figura 19 se observa la electroforesis de muestra positiva de pulmón

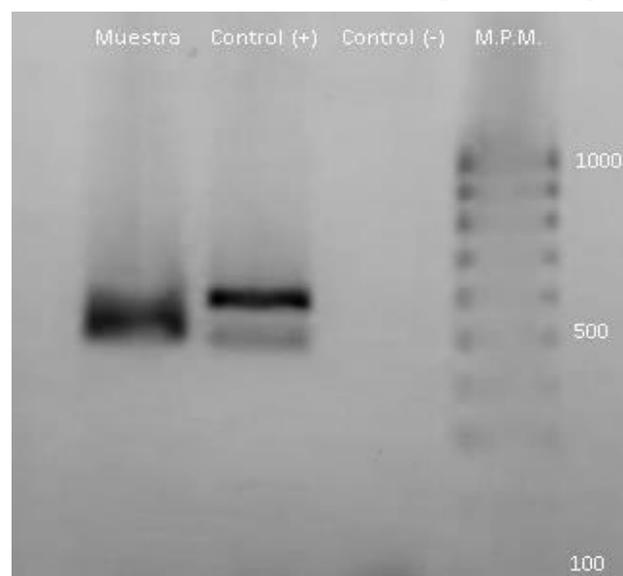


Figura 19. Electroforesis de pulmón: De izquierda a derecha se observa la muestra positiva de pulmón, seguido del control positivo (serotipo tres), el control negativo y el marcador de peso molecular.

En la figura 20 se observa la electroforesis de macerado de pulmón.



Figura 20. Electroforesis de macerado de pulmón: Se observa (de izquierda a derecha) el marcador de peso molecular, el control positivo (serotipo cinco) para el primer carril, en el segundo, en el tercer, en el cuarto, en el quinto, en el sexto y en el séptimo carril se observa un resultado negativo (debido a que no hay banda) y en el octavo carril la muestra positiva de macerado de pulmón.



En la figura 21, 22 y 23, se observan la secuencia de los “primers” utilizados para la identificación de los serotipos 1, 3 y 5 de *A. pleuropneumoniae*.

En la figura 21, se observa la secuencia de los cebadores utilizados para la identificación del serotipo 3 de *A. pleuropneumoniae*; se puede observar, la secuencia correspondiente de 5’->3’ de los “primers”, el primer oligonucleótido tiene una longitud de 22, una Tm (se define como la temperatura a la que se ha desnaturalizado la mitad del DNA de la muestra que estamos calentando. Por tanto, cuanto mayor es la densidad del DNA, mayor es su contenido en G+C y mayor es su temperatura de fusión (Tm)) de 56.70, el porcentaje de Guanina y Citocina y sus respectivas autocomplementariedades.

Posteriormente se observa una longitud de producto de 418pb, el cebador delantero, en la primera posición se localiza en el número 1122018 de empalme y termina en la posición 22 del lugar 1121997, el “primer” reverso de la primera posición de empalme, se localiza en el número 1121601 y termina en la posición 23 en el número 1121623.

Primer pair 1

	Sequence (5’->3’)	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3’ complementarity
Forward primer	TTATCCGAACCTTTGGTTTAGCC	22	56.70	40.91	5.00	3.00
Reverse primer	CATATTTGATAAAACCATCCGTC	23	53.92	34.78	6.00	1.00

Products on target templates

>[CP000687.1](#) Actinobacillus pleuropneumoniae serovar 3 str. JL03, complete genome

```
product length = 418
Forward primer 1 TTATCCGAACCTTTGGTTTAGCC 22
Template 1122018 ..... 1121997

Reverse primer 1 CATATTTGATAAAACCATCCGTC 23
Template 1121601 ..... 1121623
```

Figura 21. Secuencia de los “primers” utilizados para la identificación del serotipo 3 de *A. pleuropneumoniae*; se puede observar, la secuencia correspondiente de 5’->3’ de los primers utilizados, la Tm, el porcentaje de Guanina y Citocina y sus respectivas autocomplementariedades, la longitud de producto de 418pb, el “primer” delantero, el “primer” reverso.



Figura 22, serotipo 1

>[CP029003.1](#) Actinobacillus pleuropneumoniae serovar 1 str. 4074 chromosome, complete genome

```
product length = 418
Forward primer 1      TTATCCGAACTTTGTTTAGCC 22
Template         1192777 ..... 1192756

Reverse primer 1      CATATTTGATAAAAACCATCCGTC 23
Template         1192360 ..... 1192382
```

Figura 22. Se Observa el empalme del serotipo 1, a una longitud de producto de 418pb, el “primer” delantero en la primera posición de 1192777 de empalme y termina en la posición 22 del lugar 1192756, el “primer” reverso de la primera posición se localiza en el número 1192360 de empalme y termina en la posición 23 en el número 1192382. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> el día 10 de junio de 2018

Figura 23, serotipo 5b

>[CP000569.1](#) Actinobacillus pleuropneumoniae L20 serotype 5b complete genome

```
product length = 418
Forward primer 1      TTATCCGAACTTTGTTTAGCC 22
Template         1156120 ..... 1156099

Reverse primer 1      CATATTTGATAAAAACCATCCGTC 23
Template         1155703 ..... 1155725
```

Figura 18. Se Observa el empalme del serotipo 5b, a una longitud de producto de 418pb, el “primer” delantero en la primera posición de 1156120 de empalme y termina en la posición 22 del lugar 1156099, el “primer” reverso de la primera posición se localiza en el número 1155703 de empalme y termina en la posición 23 en el número 1155725. Tomado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> el día 10 de junio de 2018

Los “primers” no son específicos porque tienen el mismo tamaño, por el peso y el desplazamiento, al tener todos el mismo tamaño, los oligonucleotidos solo lo identifican, no diferencian entre serotipos



En el cuadro número 7, se localiza el número total de muestras analizadas, así como su posterior resultado.

Número	Órgano	Macerado	Resultado	Granja
1	Pulmón	No	Negativo	1
2	Tonsila	No	Negativo	1
3	Pulmón	No	Negativo	1
4	Tonsila	No	Negativo	1
5	Tonsila	No	Negativo	1
6	Pulmón	No	Negativo	1
7	Tonsila	No	Negativo	1
8	Pulmón	Sí	Negativo para ambos casos	2
9	Tonsila	Sí	Negativo para ambos casos	2
10	Pulmón	Sí	Negativo para ambos casos	2
11	Tonsila	No	Negativo	2
12	Tonsila	No	Negativo	3
13	Pulmón	No	Negativo	3
14	Pulmón	Sí	Negativo para el órgano sólido, Positivo para el macerado	4
15	Pulmón	Sí	Negativo para el órgano sólido, Positivo para el macerado	4
16	Pulmón	Sí	Negativo para el órgano sólido, Positivo para el macerado	4
17	Pulmón	Sí	Negativo para ambos casos	4
18	Tonsila	Sí	Positivo para ambos casos	4
19	Corazón	No	Positivo	5
20	Tonsila	Sí	Positivo para ambos casos	6
21	Pulmón	Sí	Negativo para ambos casos	5
22	Pulmón	Sí	Negativo para ambos casos	7
23	Tonsila	No	Negativo	7
24	Tonsila	Sí	Negativo para ambos casos	7
25	Sin identificar	Sí	Negativo para ambos casos	7
26	Sin identificar	Sí	Negativo para ambos casos	7
27	Sin identificar	No	Negativo	7
28	Tonsila	Sí	Negativo para ambos casos	8
29	Pulmón	Sí	Negativo para ambos casos	9
30	Pulmón	Sí	Negativo para ambos casos	9



En el cuadro número 7, se muestra el número asignado al órgano, el órgano, si hubo o no macerado, el resultado, si fue positivo o no a la reacción de PCR (también para el macerado) y el número de la granja de la cual es proveniente la muestra.

10. Discusión

Las enfermedades pulmonares, en particular las neumonías, son una causa importante de pérdidas en la producción, principalmente en relación con la mortalidad porcina. La etiología de las neumonías es a menudo compleja, con interacciones entre patógenos y factores ambientales resultando en supresión de las defensas del pulmón y subsecuente ocurrencia de enfermedad. En algunos casos esto puede llevar a la muerte, mientras que, en otros, la enfermedad puede retroceder a lo largo de la vida, teniendo un significativo efecto negativo en el desempeño del animal. En la mayoría de los casos, la mayoría de los patógenos específicos han sido implicados en las neumonías en cerdos, como son: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* siendo los más comúnmente encontrados causando bronconeumonía en cerdos abatidos (Dal Bem, E, L, 2008).

La pleuropneumonía porcina, cuyo agente etiológico es el *Actinobacillus pleuropneumoniae*, se caracteriza por el desarrollo de bronconeumonía necrosante y hemorrágica, con exudación de fibrina, causando pleuritis. La presentación severa, y muchas veces fatal, determina perjuicios a la industria porcina (Desrosiers, 1998; Fenwick, B & Henry, S, 1994; Mores, *et al.*, 1984). La correcta identificación del patógeno es necesaria para la adopción de métodos de control y profilaxis.

Algunos patógenos respiratorios como *Pasteurella multocida*, tienen capacidad de adherirse e invadir diferentes tipos de células epiteliales, estas endocitan a la bacteria sin formar fagosomas, si no que modifica el citoesqueleto, la producción y distribución de F-actina de las células epiteliales asociándola con el patógeno para facilitar su movimiento dentro de la célula y su llegada al intersticio pulmonar extracelular (Rabier, *et al.*, 1996). El repentino inicio de una enfermedad respiratoria y de rápida diseminación que causa alta morbilidad y mortalidad, sugiere la presencia de *A. pleuropneumoniae*. Los cerdos pueden morir de repente sin mostrar ningún signo clínico, los signos tempranos incluyen postración, alta temperatura, rigidez, y quizás, vómito y diarrea. A medida que la enfermedad progresa, hay una marcada disnea con respiración por la boca, y a veces, una descarga espumosa y sanguinolenta de la boca y de la nariz. A menudo hay una cianosis temprana periférica de las extremidades. La enfermedad no es común en cerdos adultos jóvenes a menos que se produzca en rebaños libres. En hembras gestantes con infección aguda pueden ocurrir abortos debido a la enfermedad sistémica. Los casos crónicos pueden hacerse aparentes seguidos de



un brote agudo. Durante el periodo de lactancia la transmisión de la infección puede atribuirse a la cerda madre, ya que es la fuente más cercana de contaminación por contacto directo de *App*, sobre todo si las divisiones entre una jaula de maternidad y otra son de un material sólido. En el caso de panel de alambre metálico existe la posibilidad de transmisión entre lechones de una camada a otra. La tos crónica y el lento crecimiento son signos de infección crónica por *A. pleuropneumoniae*, debido a la presencia de adhesinas pleurales y abscesos en los pulmones. En muchas explotaciones *App* está presente de forma subclínica y las bacterias están confinadas en las criptas de las tonsilas. Estos cerdos infectados subclínicamente pueden ser portadores y una fuente de *Actinobacillus pleuropneumoniae* para el resto del rebaño [F., G, P, 2016].

Entre los mecanismos de defensa que el cerdo muestra para combatir la infección están las células que participan en el proceso inflamatorio (neutrófilos, macrófagos, células endoteliales, linfocitos, fibroblastos y plaquetas) y sus respectivos mediadores (citocinas) que son producidos por éstos, como se ve en las inflamaciones aéreas por *Mycoplasma pneumoniae* (Martín, *et al*; 2001). Choi, *et al*; (1999), empleando cerdos naturalmente infectados, determinan que existe una fuerte expresión de IL-1 en células endoteliales dañadas dentro de los límites de las zonas de necrosis coagulativa, con una expresión simultánea de IL-1, TNF- α e IL-6 asociadas a las lesiones pulmonares, sugiriendo que estas citocinas del sistema inmunitario, juegan un papel crucial en la medición y regulación de la inflamación celular durante la infección por *App* serotipos 2, 5 y 6. Sin embargo no son capaces de eliminar al patógeno. En el presente trabajo, como se puede observar en las figuras 12 y 13, Jensen (1999), menciona que una de las manifestaciones patológicas de la infección causada por los factores de virulencia de *App* (así como las células del proceso inflamatorio y sus citosinas) es caracterizado por fibrosis, debido al aumento en la cantidad de fibras elásticas en su fase aguda. Como se puede observar en las imágenes, se aprecian las lesiones crónicas presentando daño necrótico bilateral. Cornejo, 2006, demuestra que en la infección crónica existe un daño en tejido pulmonar a nivel del epitelio alveolar, observándose engrosamiento del tejido conectivo y engrosamiento de los tabiques interalveolares, debido al aumento en las fibras de colágena, causando fibrosis. También muestra el rasurado del endotelio vascular debido a la PP crónica. Wang, *et al*; 2000 observan que aproximadamente el 30 % de neutrófilos responden contra la infección aguda por *App*. Jo (1999) menciona que las citocinas TNF- α , IL-1 e IL-8 producen una respuesta inflamatoria, por lo tanto, una infiltración de macrófagos, neutrófilos y leucocitos.

Jensen (1999) menciona que una de las manifestaciones patológicas de la infección por *A. pleuropneumoniae* es caracterizado por fibrosis (aumento en la cantidad de fibras elásticas) en su fase aguda. En la fase crónica se ha reportado fibrosis por aumento de fibras colágenas. La infección se produce por vía aérea, es decir por aerosol o por contacto directo entre el animal enfermo y un animal sano. Se ha demostrado en diferentes estudios que *A. pleuropneumoniae* coloniza las tonsilas y el epitelio alveolar; en infecciones



experimentales se han observado lesiones pulmonares que comienzan a ser evidentes a las tres horas post-infección y continúan, posteriormente, de forma progresiva. En el pulmón, el microorganismo es fagocitado rápidamente por los macrófagos alveolares, pero debido a la producción de las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII (que tienen un marcado efecto tóxico para los macrófagos alveolares), la fagocitosis no actúa adecuadamente. Las toxinas también afectan a las células endoteliales de los vasos capilares alveolares y sus efectos son los causantes de las lesiones típicas de esta enfermedad [Gottschalk, M, 2012]. Como se muestra en el cuadro número siete, se trabajó con diferentes tipos de órganos de cerdos, como son: pulmón, tonsilas y corazón; estas muestras, fueron trasladadas de distintas granjas del bajío en recipientes de unicel (dentro de los cuales llevaban refrigerantes, para así mantener a las muestras lo más óptimas posibles hasta su estudio); al llegar al laboratorio de virología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, del edificio de posgrado en Campo 1, se refrigeraron a una temperatura de -20°C . Para su mejor identificación, a las muestras se les fue asignado un número y, por consiguiente, a las muestras provenientes de dichas granjas (y que hayan resultado ser positivas) se les asigno de igual forma un número representativo, por lo que esta forma de organización, se ve reflejada en el cuadro número siete, recordando que estas muestras son provenientes de distintas granjas del bajío de la República Mexicana.

Estas muestras fueron tomadas de distintas granjas de forma aleatoria, las muestras se obtuvieron de cerdos con presencia de síntomas de una edad no mayor a dos años de vida y posteriormente sacrificados, fue un muestreo de distintos órganos de 30 cerdos (un órgano por cada cerdo) provenientes de granjas reportadas con problemas respiratorios. Para la toma de muestra y su posterior análisis, se realizaron en primera instancia, las condiciones debidas de esterilidad (asepsia de la mesa, esterilización de material a usar, entre otros): se tomó al órgano infectado (pulmón, corazón y tonsilas) y se colocó el órgano sobre la mesa de trabajo, esta mesa de trabajo contó con los mecheros (en este caso se utilizaron mecheros de Fisher) ya encendidos, gasas, tijeras, espátula, alcohol al 70%; como se observa en la figura número 12, el daño necrótico es bilateral y claramente visible, se observó las zonas donde era más eficiente la recolección de la muestra y se procedió a la disección aséptica, para ello se realizó una esterilización en “cruz” (o en “x”), como se muestra en la figura número 13, donde ya es visible la toma de muestra a una profundidad aproximada de 1.5cm^3 . Las muestras fueron tomadas por duplicado, tomándose de un extremo del órgano, del lado contrario de donde se obtuvo la primera muestra, de la zona necrosada y de una zona donde el daño no ha sido tan grave. Además de tener el órgano “sólido” (llamándolo así, como órgano completo sin macerar), se procedió a realizar la técnica de macerado, la cual consiste en tomar una porción del órgano de 1.5cm^3 de profundidad (como se ha explicado con anterioridad) de la zona necrosada y de una zona donde el daño no ha sido tan grave, con la excepción de que se colocó dicha muestra en maceradores tipo Tem Broek, añadiendo 4mL de una solución amortiguadora de fosfato salino (conocido también por sus siglas en inglés, PBS, de phosphate buffered saline) y se procedió a macerar por un tiempo aproximado de 5 minutos;



una vez teniendo el macerado, se depositó en tubos eppendorf y se almacenaron junto con las muestras obtenidas del órgano “sólido” a una temperatura de -10 a -20°C aproximadamente para su posterior estudio. En contraste, se realizó a la par el aislamiento, identificación y purificación de muestras de bacterias de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, provenientes de los serotipos 1, 3 y 5, estas cepas estaban localizadas en cámara criogénica, por lo que primordialmente se descongelaron a una temperatura de 37°C (cabe mencionar que era posible la contaminación de las cepas, por lo que se sometieron a varios procesos de siembra e identificación para evitar alguna anomalía), al no ser considerados microorganismos muy exigentes y crecer bien en distintos tipos de medios de cultivo (suplementados con NAD⁺), se utilizó agar BHI con cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, también puede utilizarse *S. intermedius* (produciendo NAD⁺ y permitiendo un crecimiento satélite [Fenwick B., *et al*, 1994]), con estría de COWAN para su primer crecimiento; se les realizaron pruebas bioquímicas primarias para su aislamiento e identificación y posteriormente se sembraron en medios con agar PPLO + NAD⁺ (todos los medios fueron preparados según las especificaciones del proveedor), al tener la certeza de que efectivamente las cepas no estaban contaminadas, nuevamente se les realizaron las pruebas bioquímicas primarias para corroborar que efectivamente era la bacteria adecuada y estaba libre de alguna contaminación. En muestras muy contaminadas se utilizan medios selectivos (con bacitracina, cloxacilina o lincomicina) [Rapp VJ; *et al*, 1985].

Las bacterias aisladas y purificadas en los diferentes medios de cultivo, se colocaron en la incubadora a 37°C por 24 hrs, posteriormente se les realizó la tinción de Gram dando como resultado Gram negativas observándose bacilos cortos a un aumento de 100X (Fig. 14). En el agar BHI con la estría de COWAN, a tras luz, se observó el satelitismo, era evidente el crecimiento de las colonias alrededor de la cepa nodriza (Fig. 15), en el agar PPLO+NAD⁺ se observa a la bacteria ya purificada (Fig. 16).

Una vez teniendo a los órganos y a las bacterias ya preparadas para su estudio, se realizó la estandarización de diferentes “primers” u oligonucleótidos para la identificación y confirmación de los serotipos 1, 3 y 5 de *A. pleuropneumoniae* presentes en muestras de tejido provenientes de cerdos de no más de dos años de vida de distintas granjas del bajío, utilizando la técnica de PCR de punto final. En la figura 21, 22 y 23, se observan la secuencia de los “primers” utilizados para la identificación de dichos serotipos. En la figura 21, se observa la secuencia de los cebadores utilizados para la identificación del serotipo 3 de *A. pleuropneumoniae*; se puede observar, la secuencia correspondiente de 5’->3’, la Tm, el porcentaje de Guanina y Citocina y sus respectivas autocomplementariedades, la longitud de producto de 418pb, el “primer” delantero y el “primer” reverso. En la figura 22, se observa el empalme del serotipo 1, a una longitud de producto de 418pb, el oligonucleótido delantero en la primera posición de 1192777 de empalme y termina en la posición 22 del lugar 1192756, el oligonucleótido reverso de la primera posición se localiza en el número 1192360



de empalme y termina en la posición 23 en el número 1192382 y en la figura 23, se observa (de igual forma) el empalme del serotipo 5b, a una longitud de producto de 418pb, el cebador delantero en la primera posición de 1156120 de empalme y termina en la posición 22 del lugar 1156099, el cebador reverso de la primera posición se localiza en el número 1155703 de empalme y termina en la posición 23 en el número 1155725.

Schaller cols (2001) informaron acerca de una prueba de PCR que identificaba al *App* a través de la amplificación de una fracción génica codificante de la toxina apxIVA, que resultó ser mucho más sensible que el cultivo bacteriológico tradicional. Fittipaldi y cols (2003) más recientemente compararon distintas técnicas de PCR contra cultivos tradicionales de tonsilas y concluyeron que la PCR era más sensible que el cultivo tradicional ya que aún podía detectar al organismo en muestras donde había perdido la viabilidad y que tenía buena correlación con los animales serologicamente positivos, proponiendo que podía ser utilizado como método complementario de diagnóstico en los animales serologicamente positivos. Otros investigadores desarrollaron métodos de PCR multiplex con el objetivo de identificar especie y serotipo al mismo tiempo, usando los "primers" adecuados (Jessing y cols, 2003).

Cuadro número 8. Patrones observados de la PCR para los genes *apx /omlA* de las cepas del biotipo 1 de *A.pleuropneumoniae* de pulmones y amígdalas [Gram T; *et al*, 2000]

apx/omlA pattern	Serotype	apxI	apxII	apxIII	omlA I	omlA II	omlA III	omlA IV	omlA V
1	1, 9, 11	+	+		+				
2	2, 8 ^a		+	+		+			
3	3		+ ^b	+			+		
4	4		+	+				+	
5	5	+	+						+
6	6		+	+			+		
7	7		+				+		
8	10	+							+
9	12		+		+				

^a La cepa de referencia serotipo 8 (405) produjo un producto de PCR omlA II, mientras que los aislados de campo del serotipo 8 produjeron un producto de PCR omlA III.

^b El serotipo 3 está desprovisto del gen para la secreción de la toxina ApxII.

La virulencia/infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* está influenciada por polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos, proteínas de membrana, factores de adhesión y



exotoxinas. De este modo, los sistemas de tipificación molecular para identificar este tipo de bacterias, se basan en los genes *apx* y *omlA* [Gram T; *et al*, 2000 y Rayamajhi N; *et al*, 2005]. Como se muestra en el cuadro número 8, las bacterias a las cuales caracterizó por PCR Gram T; *et al*, (2000) (las cuales dieron positivo para algún tipo de gen, siendo estos genes *apx* u *omlA*); al tomarlo como referencia, se confirmó que los “primers” utilizados en este estudio son efectivos para identificar la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotipos 1, 3 y 5 para este caso) en muestras con/sin daño aparente por PP. Si los animales presentan síntomas correspondientes a la infección y se tiene la teoría, de que la infestación puede ser producida por alguna bacteria correspondiente al complejo respiratorio porcino, pero no se tiene la certeza de que sea *App*, se procederá a realizar el diagnóstico molecular por PCR, ya que es un método bastante efectivo para la identificación y su confiabilidad en los resultados es muy elevada, reduciendo así el margen de error al mínimo posible y confirmando con una enorme certeza la presencia de *A. pleuropneumoniae* en los animales infectados, presentando o no, síntomas correspondientes al CRP. Debido a que es posible que se puedan identificar más serotipos (ya que son específicos para detectar a los genes *apx* provenientes de la bacteria *App*), únicamente se necesitaran las cepas de referencia correspondientes para cada serotipo, como pueden ser, el serotipo 2, 4, 6, 7, entre otros, confirmando así su absoluta presencia.

Sin embargo, según estudios anteriores el gen *omlA* ha mostrado ser el más adecuado para esta especie de *Actinobacillus*, por lo que no hay que descartar el uso de “primers” para su identificación [Rayamajhi N; *et al*, 2005; Zhou L; *et al*, 2008].

Como se observa en la figura 17, después de tener estandarizados los “primers”, se realizó la PCR y su posterior electroforesis de una muestra de la cepa ya purificada para obtener el control positivo, el resultado fue favorable para este control, se observa que el resultado es a 418pb como lo mencionan Janine T. Bossé; *et al*, 2014; L. Zhou; *et al*, 2011, realizado en gel de agarosa, al 1.5% mediante electroforesis. Posteriormente, en la figura 18, se observa uno de los productos amplificados obtenidos empleando DNA de distintos aislados de *App* de una de las granjas muestreadas. La muestra del cuarto carril se puede observar como positiva a la identificación de *App*, esta es una muestra de tonsila (tejido sólido), en la figura 19, se observa la muestra positiva de pulmón; en la figura 20, se observa la electroforesis de macerado de pulmón en el octavo carril. Se determinó que *A. pleuropneumoniae* es capaz de colonizar a los cerdos desde la primera semana de edad, lo que concuerda con Marstseller TA, Fenwick, (1999), que indican esta posibilidad cuando los cerdos de la maternidad están infectados. Los estudios realizados por Hernández, *et al*; demostraron la presencia de *A. pleuropneumoniae*, en cerdos que actúan como portadores sanos. Además, esto se relaciona con reportes realizados por éstos mismos autores, quienes informan que la mayoría de las piaras a nivel mundial están endémicamente infectadas con *App* y en este trabajo, debido a que el 20% de las granjas porcinas muestreadas resultaron ser positivas a la detección molecular de *App*, nos indica que una proporción de granjas presenta cerdos con la enfermedad clínica, estos resultados, sugieren que es posible que los



animales no sólo hayan estado contagiados por *App*, si no por alguna otra bacteria correspondiente al complejo respiratorio porcino (o por otra afección); aunque los estudios realizados por Auger, E., *et. al*; en el 2009, mencionan que *App* es uno de los principales agentes bacterianos asociado con el Complejo Respiratorio Porcino, no por ello significa que sea el único. Se ha establecido que *A. pleuropneumoniae* es un colonizador tardío. Se considera que el destete a una edad de 10 días reduce el riesgo de colonización hasta en un 90%; Mendoza y Ciprian, (2002), y que el destete a 16 días reduce en un 50% el riesgo de encontrar un cerdo colonizado.

Como se muestra en el cuadro número 8, las muestras positivas en su mayoría resultaron ser provenientes del macerado, en relación con el órgano “sólido”; por ende, se puede deducir que el método de macerado fue más efectivo gracias a que, al momento de realizar la disgregación, se utilizó una solución amortiguadora de fosfato salino, la cual (contiene diluyentes isotónicos tales como la solución salina (al 0,75 - 0,9%) o solución salina tamponada con fosfato), estas soluciones se utilizan sistemáticamente para preparar suspensiones de células microbianas, por ejemplo, para suspensiones de bacterias en procedimientos de sensibilidad antimicrobianas; la solución amortiguadora de fosfato salino lleva en su preparación las sales contenidas en estos líquidos de suspensión, proporcionan un medio isotónico para mantener la integridad y viabilidad de las células; un valor de pH fisiológico (de 6,8 a 7,4) puede ser importante para mantener la viabilidad. El cloruro sódico proporciona protección osmótica a las células microbianas. Además, los fosfatos suministran un pH fisiológico estable que también es importante para el mantenimiento de la viabilidad de las células [modificado de <http://www.bd.com>]. Por esta razón, al tener a los microorganismos en esta solución y después del procedimiento de macerado, es factible que se hayan obtenido un mayor número de casos positivos, ya que los microorganismos presentan mayor estabilidad en su integridad que cuando es el órgano completo o “sólido”.

Dicho de otra forma, al momento de utilizar el órgano “sólido” junto con el equipo de diagnóstico (kit), es posible que las soluciones que en él se utilizan no sean capaces de llegar a la profundidad del órgano, ya que los recubre una capa de tejido necrosado y la integridad del DNA se ve bastante afectada, por lo que al momento de realizar la PCR los resultados pueden variar debido a que dichas soluciones no son capaces en un 100% de realizar su labor, además de que es posible que no lleguen a la profundidad del órgano en el cual, se encuentra una mejor integridad de DNA, en cambio, en el macerado, aparte de que se ha macerado el órgano y se ha liberado material genético en mejores condiciones, la solución PBS es un medio muy favorable para mantener la integridad de las células, por tanto, al momento de utilizar el equipo de diagnóstico, este puede realizar su función en su totalidad y mantener el DNA lo más estable posible hasta su estudio por la PCR y su posterior visualización en la electroforesis.



En éste estudio se observó que la frecuencia de presentación de *A. pleuropneumoniae*, se encuentra en un rango del 20%. Esto puede ser debido a que su propagación es altamente contagiosa y frecuente lo que da como resultado efectos negativos en los parámetros productivos de los cerdos como lo menciona Benga *et al.*, 2009.

Otra razón que menciona Buettner, *et al.*, en el 2008, pudiera ser la transmisión de la enfermedad de los cerdos sanos o portadores. O bien ya que representan la principal fuente de infección de cerdos susceptibles, facilitando así su dispersión por contacto directo o a través de aerosoles como lo reportan Gottschalk y Taylor en el 2006.

Otras causas que han sido reportadas por Stewart y Franklin en el 2008 es la propiedad fenotípica que tiene el *App* de formar biopelículas, siendo éste un factor importante para la colonización, virulencia y transmisión del agente. El procedimiento de macerado del tejido resulto ser un procedimiento adecuado para el aislamiento de *A. pleuropneumoniae*.



11. Conclusiones

En este estudio se pudieron observar las ventajas del uso de la técnica de PCR para la identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en muestras de diferentes tejidos de cerdos, provenientes de distintas granjas porcícolas del bajío de la República Mexicana, nos permitió realizar un diagnóstico confiable, aunque desgraciadamente es necesario sacrificar al animal para poder recolectar la muestra.

Las enfermedades en el cerdo principalmente las que competen al sistema respiratorio pueden producirse como consecuencia de un mal manejo de la piara, ya sea por una mala alimentación, hacinamiento de los animales, falta de higiene en las granjas porcícolas, así como factores de estrés como el modo en que se transportan los animales de un lugar a otro; a partir de animales con enfermedad aguda es más indicado realizar las debidas precauciones para evitar que a los animales se les propague la afección . En el caso de los portadores crónicos, la presencia de un número bajo de bacterias en el tracto respiratorio y su mezcla con la microbiota, dificulta enormemente su recuperación hasta el punto de que se imposibilita el aislamiento. La cantidad de bacterias en lesiones crónicas es baja [Rodríguez, Ferri, EF; *et al*, 2003].

La confiabilidad en la técnica de PCR es debida a sus características de su sensibilidad y especificidad como lo han indicado Liu, H. X., *et. al.*, (2007). Contra otros estudios que reportan que se detecta éste microorganismo con otras técnicas de diagnóstico, en las cuales no se obtienen resultados confiables, como las que han mencionado Williams (2002); dado a que *A. pleuropneumoniae* se encuentra asociado con *P. multocida*, *H. parasuis* e incluso *M. hyopneumoniae*, lo que complica su identificación. Otra razón por la cual otras técnicas diferentes a la PCR no pueden ser confiables es debido a que los cerdos vacunados con una vacuna de subunidades conteniendo las toxinas Apx I, Apx II y Apx III resultan negativos a esta técnica, según lo reporta Dreyfus, A., *et. al*; en el 2004.

El conocimiento previo de las secuencias genéticas de los agentes infecciosos es otro de los requisitos fundamentales para el éxito de la tipificación molecular por PCR, cada organismo biológico presenta zonas específicas que permiten distinguirlos de los demás organismos; dependiendo del tipo de diagnóstico deseado, la selección del gen o zona del gen que va a servir de molde varía. Hoy en día, la PCR se aplica en diferentes áreas de las ciencias biológicas y de la salud, formando parte del quehacer científico de muchos laboratorios de investigación, que la utilizan principalmente para expresión génica, genotificación, detección de patógenos y análisis de mutaciones; por tanto, se comprobó que los “primers” estandarizados para la identificación para el diagnóstico y la identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en muestras biológicas como son tejidos, resulto ser efectiva y certera al momento de llevarlos a prueba. Sólo un 20% de las granjas porcinas muestreadas fueron positivas a la detección molecular de *App* lo que indica que es posible que los animales no



sólo hayan estado contagiados por dicha bacteria, si no por alguna otra correspondiente al complejo respiratorio porcino; se recomienda realizar pruebas de diferenciación para tener un mayor conocimiento sobre que especie patógena esté afectando a las granjas de estudio

El procedimiento de macerado resulto ser un procedimiento bastante adecuado para la identificación de *A. pleuropneumoniae* y sería útil hacer una comparación con otras técnicas de diagnóstico como son: inmunohistoquímica, anticuerpos monoclonales, raspado epitelial, pruebas de coagulación, entre otros, para detectar antígenos de *A. pleuropneumoniae* y correlacionar con la sensibilidad de la prueba.



12. Referencias

- Ajito, T., Haga, Y., Homma, S., Goryo, M., Okada, K. (1996). "Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1". J Vet Med Sci 58(4): 297-303.
- Altcheh, J., Biancardi, M., Lapena, A., Ballering, G. y Freilij, H., (2005). "Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Ninos, Ricardo Gutierrez, Buenos Aires, Argentina". Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38 (Suppl. 2): 41-45.
- Auger, E., Deslandes, V., Ramjeet, M., Contreras, I., Nash, J.H., Harel, J., Gottschalk, M., Olivier, M., Jacques, M., (2009). "Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells". Infect Immun. 77(4):1426-41.
- Bandara A.B., Lawrence M.L., Veit H.P., Inzana T.J., (2003). "Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs". Infect. Immun. 71:3320–3328.
- Baarsch MJ, Scamurra RW, Burger K, Foss DL, Maheswaran SK, Murtaugh MP. (1995). "Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*". Infect Immun; 63: 3587–3594.
- Benga, L., Hoeltig, D., Rehm, T., Rothkoetter, H.J., Pabst, R., Weigand, P.V., and Fugato-consortium, I. (2009). "Expression levels of immune markers in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infected pigs and their relation to breed and clinical symptoms". Vet Res. 5:13.
- Blackall, P.J., Klaasen, H.L.B.M., Van Den Bosch, H., Kuhnert, P., and Frey, J., (2002). "Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15". Vet. Microbiol. 84:47-52.
- Boekema, B. K., Kamp, E. M., Smits, M. A., Smith, H. E., Stockhofe-Zurwieden, N., (2004). "Both ApxI and ApxII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 are necessary for full virulence". Vet. Microbiol. 20;100(1-2):17-23.
- Bosse' J.T., Janson H., Sheehan B.J., Beddek A.J., Rycroft A.N., Kroll J.S., Langford P.R. (2002). "*Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection". Microbes Infect. 4:225–235.



Buettner, F. F., Bendallah, I. M., Bosse, J. T., Dreckmann, K., Nash, J. H., Langford, P. R., and Gerlach, G. F., (2008). "Analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* ArcA regulon identifies fumarate reductase as a determinant of virulence". *Infect. Immun.* 76: 2284-2295.

Caballero de la Calle, J.R; (1996). "Enfermedades respiratorias". *Porcino Sanidad*, pp 1-3.

Chiers, K, Waele, TD, Pasmans, F, Ducatelle, R, Haesebrouck, F; (2010). "Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host". *Vet. Res.* 41:65

Chien M.S., Chan Y.Y., Chen Z.W., Wu C.M., Liao J.W., Chen T.H., et al., (2009). "*Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages". *Vet. Microbiol.* 135:327–333.

Choi, C., Kwon, D., Min, K., Chae, C. 1999. In-situ Hybridization for the Detection of Inflammatory Cytokines (IL-1, TNF- α and IL-6) in Pigs Naturally Infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Comparative Pathology.* 121: 349-356.

Cornejo-Amador, M.G. 2007. Descripción del daño estructural en pulmón de cerdo portadores crónicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Tesis de Maestría en Ciencias Morfológicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.

CORTAZAR M. A; SILVA R. E. P. (2004). "MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS EN BIOTECNOLOGÍA". Universidad Nacional Autónoma de México.

Dal Bem, E, L. (2008). "*Epidemiologia e anatomopatologia de lesões pulmonares de suínos em um matadouro em cascavel – pr*". (tesis doctoral). Universidade federal do paraná. Curitiba

Desrosiers, R., (1986). "*Haemophilus epidemiology and control*". *Proc. AASP Meeting.* 493-512.

DESROSIERS, R. Control of bacterial respiratory diseases. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 1998, Birmingham. Anais... Birmingham: International Pig Veterinary Society, 1998. p.5-9.

Diagnóstico de Laboratorio. Recuperado de <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/6/diagnosticola.htm>. Consultado el día 21 de diciembre de 2017

Diccionario de cáncer. Instituto Nacional del Cancer. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/inmunohistoquimica>. Consultado el día 20 de diciembre de 2017



Dreyfus, A., Schaller, A., Nivollet, S., Segers, R. P., Kobisch, M., Mieli, L., Soerensen, V., Hussy, D., Miserez, R., Zimmermann, W., Inderbitzin, F., Frey, J., (2004). "Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA". Vet Microbiol. 19; 99(3-4):227-38.

Enríquez, V.I., Guerrero, A. L., Serrano, J. J., Godínez, D., Rosales, J. L., Tenorio, V., de la Garza, M. (2004). "Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. Microbiology".

ESTRUCTURA BACTERIANA ALUMNOS.doc. Recuperado de: https://docs.google.com/document/d/1RLfjXlAdy2PQZGJzQo7C6rECmXV8BUN0oAVVehInK_Y/mobilebasic?hl=en_US

F., G, P; Opriessing, T. (28 de abril de 2016). Enfermedad causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y su diagnóstico. Albéitar. Recuperado de <https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/14746/articulos-porcino/enfermedad-causada-por-actinobacillus-pleuropneumoniae-y-su-diagnostico.html>

Faldyna, M. Nechvatalova, K. Sinkora, J. Knotigova, P. Leva, L. Krejki, J. Toman, M. (2005). "Experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in piglets with different types and levels of specific protection: Immunophenotypic analysis of lymphocyte subsets in the circulation and respiratory mucosal lymphoid tissue". (2005) Vet Immunol Inmunopath. 107:143-152.

Fenwick B., Henry S. (1994). "Porcine pleuropneumonia", J. Am. Vet. Med. Assoc. 204:1334-1340.

FITTIPALDI N., BROES A., HAREL J., KOBISCH M., GOTTSCHALK M. (2003). "Evaluation and field validation of PCR test for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs". J. Clin. Micro. 41:5085-5093.

FORMAS CLÍNICAS Y LESIONES Recuperado de <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/6/formas.htm>. Consultado el día 30 de diciembre de 2017

Garza, V.R; López L.M; Saavedra, T. M.R. "La reacción en cadena de la polimerasa y su aplicación al diagnóstico de laboratorio de las enfermedades bacterianas". Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Xochimilco.

Gottschalk M., Taylor D.J., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, in: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. (Eds.); (2006). "Diseases of swine", Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, pp. 563-576.



Gottschalk M; (2012). “*Actinobacillus pleuropneumoniae*, in: Straw” B.E., Zimmerman J.J., Karriker L.A; Ramirez A; Schawrtz K.J; (Eds.), Diseases of swine, Wiley-Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, pp. 661.

Gottschalk, M. “*Actinobacillus pleuropneumoniae*: an old but still relevant swine pathogen in the XXI Century”. 22nd IPVS Congress (2012), 10-13-june (2012), Jeju, Korea. p.26-30.

Gram, T., Ahrens, P., Andreasen, M., & Nielsen, J. P. (2000). “An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes - evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs”. *Veterinary Microbiology*, 75(1), 43-57.

Hernández, C. R., Chávez, G. G., Gutiérrez y Pabello, J. L., (2002). “Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biotipo 1, Serotipo 1, de pulmones de cerdo con y sin lesiones neumónicas utilizando la técnica de inmunohistoquímica”. *Vet. Mex.* 33(4):355-362.

Hernández H, F, C; Rodríguez H, M. (2009). “Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas”. *Salud Publica Mex* 2009;51 supl 3: S424-S438.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2018). Recuperado de <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/ganado/> Consultado el día 30 de noviembre de 2017

Janine T. Bossé,^a Yanwen Li,^a Øystein Angen,^b Lucy A. Weinert,^c Roy R. Chaudhuri,^{c*} Matthew T. Holden,^{d*} Susanna M. Williamson,^e Duncan J. Maskell,^d Alexander W. Tucker,^d Brendan W. Wren,^f Andrew N. Rycroft,^g Paul R. Langford,^a on behalf of the BRaDP1T consortium. (2014). “Multiplex PCR Assay for Unequivocal Differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serovars 1 to 3, 5 to 8, 10, and 12”. Creative Commons Attribution 3.0 Unported license. doi:10.1128/JCM.00685-14

Jensen, T.K., Boye, M., Hagedorn-Olsen, T., Riising, J., Angen, O. 1999. “*Actinobacillus pleuropneumoniae* Osteomyelitis in Pigs Demonstrated by Fluorescent *In Situ* Hybridization”. *Vet. Pathol.* 36: 258-261.

JESSING S., ANGEN O., INZANA TJ. (2003). “Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5 and 6”. *J. Clin. Micro.* 41:4095-4100.

Jo, B.M., Foss, D.L., Murtaugh, P.M. 2000. “Pathophysiologic correlates of an acute porcine pleuropneumonia”. *Annual Journal of Veterinary Research.* 61(6): 684-90.

L. Zhou; S. C. P. Jones; Ø. Angen; J. T. Bossé; J. H. E. Nash; J. Frey; R. Zhou; H. C. Chen; J. S. Kroll; A. N. Rycroft; P. R. Langford. (2011). “PCR specific for *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 3”. *Veterinary Record* (2008) 162, 648-652.



Lara, J., Cortes, R., Castro, F., Escamilla, J., Quezada, F., Aranda, M., Lozano, B., Sarfati, D., Soto, E. y Antillón, A. (2006). “El diagnóstico molecular y PRRS: Aplicaciones prácticas”. Congreso Nacional AMVEC

Leidy Johanna Gonzalez Valencia. (2016). *Mycoplasma hyopneumoniae, Actinobacillus pleuropneumoniae e Influenza porcina microorganismos asociados al complejo respiratorio porcino en una granja porcícola de sitio III en Cartago – Valle del Cauca*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Caldas-Antioquia

Libro de introducción a la microbiología (google books pp.323-324). Recuperado de https://books.google.com.mx/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA323&lpg=PA323&dq=Un+serotipo+se+identifica+por+sus+ant%C3%ADgenos+K+y+O&source=bl&ots=za_jnN7XpE&sig=R8BVDAnFS3AzJFOWPK8t-L3zv38&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjnpPjGsdbZAhVRgK0KHQo7C5MQ6AEIajAH#v=onepage&q=Un%20serotipo%20se%20identifica%20por%20sus%20ant%C3%ADgenos%20K%20y%20O&f=false Consultado el día 19 de diciembre de 2017

Liu, H. X., Zhu, P., Zhang, Y., Wang, H. X., DU, J. W., Liu, J., Gu, J. Y. y Ou, Y., (2007). “Real-time PCR array for simultaneous detection of 37 kinds of fusion genes in leukemia”. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 87:526-532.

Manual de Buenas Prácticas de Producción en Granjas Porcícolas http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Manuales%20de%20Buenas%20Prcticas/Attachments/6/manual_porcino.pdf

MANUAL DEL PARTICIPANTE PRODUCCIÓN DE CERDOS (2005). <http://www.ciap.org.ar/ciap/Sitio/Archivos/14960672-Manual-de-Produccion-Cerdos.pdf>

Martin, J.R., Wei, C.H., Honour, M.J., Harbeck, J. 2001. Airway inflammation and Bronchial Hyperresonsiveness after *Mycoplasma pneumoniae* infection in murine model. *Cell Mol Biol.* 24: 577- 582.

Marstseller TA. Fenwick, B. (1999). *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. *Swine Health Prod.* (7) : 161-165.

Mendoza SE y Ciprian, A: Aplicación de la serología para el diagnóstico y control de las enfermedades del "Complejo Respiratorio Porcino" www.engormix.com/MA-porcicultura/sanidad/articulos/aplicacion-serologia-diagnostico-control-t186/165-p0.htm (2002).

Molina, L. J. (2017). “FACTORES DE PATOGENICIDAD BACTERIANA”. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html>



MORES, N.; SOUZA, J.C.de A.; NOGUEIRA, R.H.G. Estudo experimental da pleuropneumonia suína causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* (Hpp). 1- Patogenicidade e evolução das lesões anátomo-patológicas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.36, n.6, p.679-693, 1984.

OCDE/FAO (2017), “Carne”, en OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026, OECD Publishing, París. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-BT089s.pdf>

PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Recuperado de http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso_tb_mico_bacterias/reaccion_en_cadena_polimerasa.pdf

Pohl S, Bertschinger HU, 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 acid relatedness”. Inst J Syst Bacteriol; 33: 510-514.

Porcicultura.com. (2018). “En 2017 México rompió récord de producción y exportación de cárnicos”. Recuperado de <https://www.porcicultura.com/destacado/En-2017-Mexico-rompio-record-de-produccion-y-exportacion-de-carnicos>

Oliveira, C. (2011). “Detecção Molecular de Agentes Infecciosos em Suínos”. (Tesis de maestría). Universidade de Aveiro, Portugal

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). Producción y Sanidad Animal. Recuperado de <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/pigs/home.html>

Porcicultura.com. (2018). Producción de carne en México creció 3.7% en 2017. Recuperado de <https://www.porcicultura.com/destacado/Produccion-de-carne-en-Mexico-crecio-3.7%C2%AC-en-2017>

Pohl S, Bertschinger HU, 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 acid relatedness”. Inst J Syst Bacteriol; 33: 510-514.

Programa de Formación del Profesorado UNED (2000). “REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)”.



Rabier, M.J., Tyler, N.K., Walker, N.J., Hansen, L.M., Hirsh, D.C., Tablin, F. 1997. *Pasteurella multocida* enters polarized epithelial cells by interacting with host F-actin. *Veterinary Microbiology*. 54: 343-355.

Rapp VJ, Ross RF, Young TF. (1985). "Characterization of *Haemophilus spp.* Isolated from healthy swine and evaluation of cross-reactivity of complement-fixing antibiotics to *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus* taxon "Minor group"". *J Clin Microbiol*; 22: 945-950.

Rayamajhi N., Shin S.J., Kang S.G., Lee D.Y., Ahn J.M., Yoo H.S. 2005. "Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates". *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 17; 359-362.

Rigoberto Hernández C, R; Chávez G,G; Gutiérrez P, JA; (2002) "Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1 de pulmones de cerdo con y sin lesiones neumónicas utilizando la técnica de inmunohistoquímica". Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Rodríguez, Ferri, EF; Barcelo, J; Gómez, S; Sanchez Viscaino, JM. 2003. La pleuroneumonía es una de las enfermedades bacterianas más importantes de cuantas afectan el tracto respiratorio del ganado porcino. (en línea). Consultado el 01 julio de 2018. Disponible en <http://www.sanidadanimal.info/curso/6/6-actinoba.htm>

Rodríguez, F. E; Gutiérrez, C; de la Puente, V; García, N; Montér, JL; del Río, ML; García N; Blanco M; Navas, J; Ladrón, B, N; (2002). "PLEURONEUMONÍA PORCINA". *Información Veterinaria* 234:35-44.

RODRÍGUEZ, S. I.P; BARRERA, S H.A. (2004) "LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A DOS DÉCADAS DE SU INVENCION". *CIENCIA UANL / VOL. VII*, No. 3

SCHALLER A., DJORDJEVIC SP., EAMENS GJ., FORBES WA., KUHN R., KUNHERT P., GOTTSCHALK M., NICOLET J., FREY J. (2001). "Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA". *Vet. Micro*. 79:47-62.

Shakarji L., Mikael L.G., Srikumar R., Kobisch M., Coulton J.W., Jacques M., FhuA and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their role as virulence determinants, *Can. J. Microbiol.* (2006) 52:391-396.

Stewart, P. and Franklin, M., (2008). "Physiological heterogeneity in biofilms", *Nature Reviews*, 6; 199-210.



Tamay de Dios L,* Ibarra C,** Velasquillo C*. (2013) “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real”. Tecnología en salud. Vol. 2, Núm. 2

Terry M. Lo. (1997). DETECTION AND IDENTIFICATION OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* SEROTYPE 5 BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION (tesis de maestría). Veterinary Medical Sciences, Blacksburg, Virginia.

Torremorell, M., Pijoan, C., Janni, K., Walker, R and Joo, H.S., (1997). “Airbone transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory síndrome virus in nursery pigs”. Am. J. Vet Res. 58: (8): 828-832.

Turni, C; Singh, R; Schembri, M.A. and Blackall, P.J. (2014). “Evaluation of a multiplex PCR to identify and serotype *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 5, 7, 12 and 15”. Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254

Universo porcino, el portal del cerdo. (2005). Recuperado de http://www.aacporcinos.com.ar/articulos/sanidad_porcina_08_2012_actinobacillus_pleuropneumoniae_en_porcino.html

VERDUGO, D. I. E; VARGAS, G. R; JOSE DE JESUS, M. Z; DE LAGARZA, M. S. L; HAMER, B. R; GUERRERO, B. A. L; (2003). “ADHESIÓN DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* A COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR DE CERDO”. CIENCIA VETERINARIA 9

Vitelio, T. (Sin año de publicación). “Pleuroneumonía porcina. ¿Un enemigo fácil de derrotar?” [archivo PDF]. Empresa de Diagnóstico Veterinario C.A. pp 3

Wang, F., Yang, J., Hung, S.Y., Pan, I. 2007. In vitro migratory responses of swine neutrophils to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Exp Anim. 50(2): 139-145.

Williams Jose de Jesús. (2002). “Efecto del uso de antibióticos en casos clínicos de enfermedades del tracto respiratorio sobre la ganancia de peso en cerdos de engorda”. (Tesis de doctorado). Tecóman, Colima. Recuperado de http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Jose%20de%20Jesus%20Williams.pdf

Tomado de: <http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/BA/ES-BA-257204.pdf> el día 05 de agosto del 2018

Zhou L., Jones S.C.P., Angen O., Bosse J.T., Nash J.H.E., Frey J., Zhou R., Chen H.C., Kroll J.S., Rycroft A.N., Langford P.R. (2008). “Multiplex PCR That Can Distinguish between Immunologically Cross- Reactive Serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains”. Journal of Clinical Microbiology. 46: 800-803.



Zielinski, G; (2006). “INFECCIONES POR *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*: SITUACIÓN EN ARGENTINA”. Área Producción Animal.

Zimmerman, J. J; Karriker, L. A; Ramirez, A; Schwartz, K. J; Stevenson, G. W. (2012). “Diseases of swine”. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK

