



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

*Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA**

**YURITZY FLORES GODÍNEZ**

**ASESOR:** *Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira*

**COASESOR:** *Dr. Abel Ciprián Carrasco*

**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.

***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.***

---

*Agradecimientos*

*A mis padres, por la paciencia y el apoyo que me han brindado desde que inicie con mi camino, les dedico este enorme triunfo. Cada sueño hecho realidad es gracias a ustedes. Por la educación y valores que me han enseñado sé que puedo llegar a donde sea.*

*A mis amigos de la universidad, que hicieron de esta etapa una experiencia hermosa e inolvidable, que me enseñaron a sonreír aun en el peor momento y no me dejaron rendirme.*

*A mis asesores de tesis, doctora Susana y doctor Abel, agradezco su enorme apoyo y orientación.*

*Y de todas las personas, a quienes se volvieron profundamente cercanas a mí; a quien me enseñó que el amor no tiene que doler y quien me ayudó a tejer mis alas.*

*A todos ustedes, mis más sinceros agradecimientos.*

## *Índice de Tablas*

1. Tabla 1 Pruebas bioquímicas para Actinobacillus pleuropneumoniae. (Rodríguez Méndez, G. A. 2010)	9
2. Tabla 2 Características de toxinas de Actinobacillus pleuropneumoniae (Plonait, H. 2001),	13
3. Tabla 3 : Gramos obtenidos de biomasa y mililitros de solución fenolada por serotipo.	24
4. Tabla 4 Mililitros de solución fenolada y rosa de Bengala necesarios para tinción por serotipo.	24
5. Tabla 5 Numero de lavados realizados por serotipo.	25
6. Tabla 6 Cálculos ajuste de concentración con Buffer de Lactatos	25
7. Tabla 7 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 15 muestras por serotipo de granja ABC.	26
8. Tabla 8 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 10 muestras por serotipo de granja Guanajuato.	27
9. Tabla 9 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 15 muestras por serotipo de granja Herradura.	28
10. Tabla 10 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 14 muestras por serotipo de granja Ramari.	29
11. Tabla 11 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 15 muestras por serotipo de granja La Loma Jalisco.	30
12. Tabla 12 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 12 muestras por serotipo de granja El llano Guanajuato.	31
13. Tabla 13 Gramos biomasa y mililitros de solución fenolada para serotipo 1 y 3.	32
14. Tabla 14 Cálculos Rosa de Bengala	32
15. Tabla 15 Numero de lavados realizados para serotipo 1 y 3.	32
16. Tabla 16 : Cálculos ajuste de concentración con Buffer de Lactatos	33
17. Tabla 17 Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 15 muestras por serotipos 1 y 3 de granja ABC.	34

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

---

18. Tabla 18 . Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 10 muestras por serotipos 1 y 3 de granja Guanajuato.	35
19. Tabla 19 Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 15 muestras por serotipos 1 y 3 de granja Herradura.	36
20. Tabla 20. Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 14 muestras por serotipos 1 y 3 de granja Ramari.	37
21. Tabla 21 Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 15 muestras por serotipos 1 y 3 de granja La loma Jalisco.	38
22. Tabla 22 Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 11 muestras por serotipos 1 y 3 de granja El llano Guanajuato.	39

### *Índice de ilustraciones*

23. Ilustración 1 Porcentajes de muestras positivas de Antígeno A contra porcentajes de muestras positivas de Antígeno B por serotipo de granja ABC.	26
24. Ilustración 2 Porcentajes de muestras positivas de Antígeno A contra porcentajes de muestras positivas de Antígeno B por serotipo de granja Guanajuato..	27
25. Ilustración 3 . Porcentajes de muestras positivas de Antígeno A contra porcentajes de muestras positivas de Antígeno B por serotipo de granja Herradura	28
26. Ilustración 4 . Porcentajes de muestras positivas de Antígeno A contra porcentajes de muestras positivas de Antígeno B por serotipo de granja Ramari.	30
27. Ilustración 5 Porcentajes de muestras positivas de Antígeno A contra porcentajes de muestras positivas de Antígeno B por serotipo de granja La Loma Jalisco.	31
28. Ilustración 6 Porcentajes de muestras positivas con Antígeno A, Antígeno B (primer ensayo) y Antígeno B2 (segundo ensayo) de granja ABC.	34
29. Ilustración 7 Porcentajes de muestras positivas con Antígeno A , Antígeno B (primer ensayo) y Antígeno B2 (segundo ensayo) de granja Guanajuato.	35

***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.***

---

30. Ilustración 8 Porcentajes de muestras positivas con Antígeno A , Antígeno B (primer ensayo) y Antígeno B2 (segundo ensayo) de granja Herradura. 36
31. Ilustración 9 Porcentajes de muestras positivas con Antígeno A , Antígeno B (primer ensayo) y Antígeno B2 (segundo ensayo) de granja Ramari. 37
32. Ilustración 10 Porcentajes de muestras positivas con Antígeno A , Antígeno B (primer ensayo) y Antígeno B2 (segundo ensayo) de granja La Loma Jalisco. 38

*Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

*Lista de abreviaturas*

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
App	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (App)
C3	Componente 3 del complemento
CAMP	Christie Atkins-Munch-Petersen
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas
KDa:	Kilodalton.
KDO	2-ceto-3-deoxioctanato
LPS	Lipopolisacáridos
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PMNs	: Polimorfonucleares
PPLO	Pneumonia like organism, Difco
RTX	Repeats in toxin
TNF	Factor de necrosis tumoral

# *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

---

## *Índice*

1. <i>Introducción</i>	8
1.1 Generalidades	8
1.10 Control y tratamiento	20
1.2 Cultivo y serotipos.	9
1.3 Factores de virulencia	10
1.3.1 Cápsula	11
1.3.2L ipopolisacáridos	11
1.3.3 Fimbrias	12
1.3.4 Proteínas de membrana y Proteínas de unión a transferrina	12
1.3.5 Proteasas	13
1.3.6 Toxinas	13
1.4 Patogenia y mecanismos de evasión del Sistema Inmune	14
1.5 Formas clínicas	15
1.6 Respuesta Inmune	15
1.7 Epidemiología	16
1.8 Diagnóstico	17
1.8.1 Aglutinación	18
1.8.1.1 Tipos de reacciones de aglutinación según las características de las partículas aglutinantes	18
1.9 Antígeno de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y antígeno de <i>Brucella</i>	19
1.9.1 Antígeno de Huddleson	19
1.9.2 Técnica de aglutinación con Rosa de Bengala	19
2.0 <i>Objetivos</i>	21
2.1 Objetivo principal	21
2.2 Objetivos particulares	21
3.0 <i>Justificación</i>	21
4.0 <i>Materiales y método</i>	22
4.1 Lugar de trabajo	22
4.2 Muestras y cepas	22
4.3 Producción de biomasa	22
4.4 Inactivación	22
4.5 Acondicionamiento	22
4.6 Ajuste de concentración	23
4.7 Prueba con sueros de cerdos	23
5.0 <i>Resultados</i>	24
5.1 Resultados primer ensayo	24
5.2 Resultados aglutinación en placa primer ensayo	26
5.3 Resultados aglutinación en placa primer ensayo	26
5.4 Resultados segundo ensayo (solo con serotipos 1 y 3)	31
5.5 Resultados aglutinación en placa segundo ensayo	33
6.0 <i>Discusión</i>	39
7.0 <i>Conclusiones</i>	42
8.0 <i>Referencias</i>	43
Resultados aglutinación en placa primer ensayo	26



# *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

## 1. Introducción

La industria porcina se ve afectada por problemas de origen sanitario, siendo uno de los principales las enfermedades respiratorias, vistas en la forma de neumonía y pleuritis, ya sean de origen bacteriano o viral (Mori Álvarez, L. 2007).

La pleuroneumonía es una de las enfermedades respiratorias más importantes en la industria porcina, presentando un cuadro agudo 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. (Monter Flores, J. L. 2010).

En México, a partir de 1976 se observaron brotes de Pleuroneumonía porcina en varios estados como Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán y recientemente en Jalisco, Puebla, Yucatán, Guanajuato, Querétaro, Estado de México y Sonora. Los serotipos 1-8 fueron los causantes de los brotes, y el más frecuente el serotipo 1.

### 1.1 Generalidades

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) es un cocobacilo Gram-negativo pleomórfico que mide 0.5 – 1.0 x 1.0-2.0 µm. Es anaerobio facultativo, no forma esporas y es capsulado. Bioquímicamente es ureasa positiva, fermenta manitol, xilosa y ribosa con fermentación variable de lactosa. (Idalia Enríquez. V. D. 2003)

En sus primeros aislamientos fue asignado el género *Haemophilus* con la denominación de *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus parahemolyticus* y *Haemophilus pleuropneumoniae*. Posteriormente, gracias al trabajo de Pohl *et al*, en 1983 se incluyó dentro del género *Actinobacillus*, tras establecerse su estrecha relación con *el Actinobacillus lignieresii* a partir de estudios de homología del DNA. Por lo tanto su clasificación taxonómica se considera como sigue. (Rodríguez Méndez, G. A. 2010)

Phylum: Protobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pasteurellales

Familia: Pasteurellaceae

Género: Actinobacillus

Especie: *Actinobacillus pleuropneumoniae*

***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.***

Tabla 1 Pruebas bioquímicas para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (Rodríguez Méndez, G. A. 2010)

Reacción	Resultado	Reacción	Resultado
Requerimiento de factor V (NAD)	+	Maltosa	+
Porfirina a partir de ácido aminolevulinico	+	Melibiosa	-
Indol	-	Sucrosa	+
Ureasa	+	Trealosa	-
Ornitina descarboxilasa	-	Melisitosa	-
Lisina descarboxilasa	-	Rafinosa	-
Arginina dihidrolasa	-	Inulina	-
Hemólisis (sangre de cordero)	+	Almidón, soluble	-
Reacción CAMP (sangre de cordero)	+	Esculina	-
Catalasa	+	Salicina	-
Oxidasa	-	Adonitol	-
$\beta$ -galactosidasa	+	Dulcitol	-
$\alpha$ -fucosidasa	-	Glicerol	-
Fosfatasa alcalina	+	meso- Eritritol	-
L-arabinosa	-	Manitol	+
D- ribosa	+	Sorbitol	-
D-xilosa	+	Inositol	-
L-ramnosa	-	Xilitol	-
D-galactosa	+	Ácidos finales	Acético
Ácido a partir de glucosa	+		Láctico
Gas a partir de glucosa	-	Caldo glucosa	Succínico
D-fructosa	+	Celobiosa	-
D-manosa	+	Lactosa 1%	-
Sorbosa	-	Lactosa 5%	-

### 1.2 Cultivo y serotipos.

De acuerdo a su requerimiento de Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) se han descrito dos biotipos. El biotipo 1, que es dependiente de NAD, como fuente de piridin nucleótido (factor V) comprende un total de 12 serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*<sup>1</sup> En este grupo se encuentran los serotipos 1 y 5, cada uno de

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

los cuales se divide en a y b. El biotipo 2, por su parte, reúne las cepas independientes de NAD, distinguiéndose tres serotipos. (Medrano Muñoz, A. 2003).

La dificultad de aislar *Actinobacillus pleuropneumoniae* de relaciona con la presencia de otras bacterias en pulmones, las cuales pueden inhibir el crecimiento de la misma en los medios de cultivo. (Williams, J de J. 2000).

El aislamiento inicial de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se realiza con una atmosfera de CO del 5 al 7%. crece a 37 °C. En 24 a 48 horas produce colonias redondas, pequeñas, lisas brillantes de color gris blanquecino.<sup>6</sup> Para el crecimiento es necesario añadir en el laboratorio a los medios de cultivo NAD en una proporción del 0.025%, o emplear variantes de agar sangre inoculadas con una estría de *Saphylococcus aureus* beta hemolítico, de este modo, *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtiene el NAD que necesita, formando colonias satélites alrededor del estafilococo rodeadas de una zona de hemolisis completa: Christie Atkins-Munch-Petersen (Prueba de CAMP). (Monter Flores, J. L. 2010).

El medio de cultivo selectivo Pheumonia like organisn, Difco (PPLO) igualmente suplementado con NAD, ha demostrado ser altamente sensible y especifico. El caldo PPLO se emplea principalmente para el aislamiento y cultivo de *Mycoplasma spp.* Este microorganismo se descubrió en un caso de pleuroneumonía en una vaca, y se conoce como "organismos parecidos a pleuroneumonía" o PPLO. (Acumedia, 2017).

Otro medio que se puede utilizar es el agar chocolate (agar sangre alterada por calentamiento con liberación del factor NAD) el cual permite de igual forma el crecimiento de la bacteria. (Ruiz, A., Muñoz, 2011).

### 1.3Factores de virulencia

Los factores de virulencia son numerosos, no obstante, la importancia relativa y el papel que cada uno de ellos desempeña en la patogenia del proceso solo se conoce parcialmente en algunos y en otros se desconoce casi totalmente. (Monter Flores, J. L. 2010).

La patogenia se *Actinobacillus pleuropneumoniae* se considera multifactorial con implicaciones de diversos productos y estructuras de la bacteria, a los que hay que añadir los factores propios del hospedador, así como la presencia concurrente de otros agentes respiratorios. (Idalia Enríquez V. D. 2003). A continuación, se describen los diversos factores de virulencia.

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

### 1.3.1 Cápsula

Es responsable de la especificidad del serotipo de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.<sup>3</sup> Confiere protección frente a la fagocitosis y a la lisis mediada por el complemento, tanto en presencia de anticuerpos específicos (vía clásica), como en ausencia de estos (vía alternativa). Se localiza alrededor de la membrana externa.<sup>5</sup> Está cargada negativamente y se compone de unidades repetidas de oligosacáridos, polímeros de ácido teicoico unidos por enlaces fosfodiéster o polímeros de oligosacáridos unidos por enlaces fosfato. (Monter Flores, J. L. 2010).

Aunque no induce la enfermedad clínica o lesiones pulmonares en porcinos, la capsula es esencial para la virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae in vivo*, probablemente como un factor de virulencia que permite a la bacteria resistir al ambiente antibacteriano producido por el sistema inmunológico del hospedero. (Mori Álvarez, L. 2007).

### 1.3.2 Lipopolisacáridos (LPS)

El LPS es una molécula glucolípida anclada a la membrana externa y considerada como el antígeno de superficie más importante de las bacterias Gram (-) Se estima que una bacteria Gram (-) posee unas  $3.5 \times 10^6$  moléculas de LPS que ocupan un área de  $4.9 \mu\text{m}^2$ , correspondiente a las  $\frac{3}{4}$  partes de la superficie bacteriana. (Romero Hurtado, S, 2010).

La molécula se compone de dos regiones principalmente, un glucolípido llamado lípido A y un heteropolisacárido conocido como el *núcleo o core* unidos entre sí por el azúcar ácido 2-ceto-3-deoxioctanato (KDO). El lípido A se le reconoce como la fracción biológicamente activa de la molécula, se trata de un disacárido (glucosamina) unido a ácidos grasos que por lo general son ácido caproico, laurico, mirístico, palmítico y esteárico los cuales están insertos en la membrana externa de la bacteria. El core se subdivide en core externo (formado por hexosas y el core interno (formado por heptosas).<sup>9</sup> En algunos microorganismos el LPS presenta una región sacárida adicional conocida como antígeno O, el cual es un polímero de unidades repetidas que consta de 1 a 8 residuos glucosídicos altamente variables entre especies bacterianas. (Romero Hurtado, S, 2010)

En *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la caracterización inicial de estos LPS según su composición de azúcares, reveló 3 tipos de estructuras que pudieron ser clasificadas en lisas (serotipos 2.4.7) rugosas (serotipos 3.6) y semirugosas (serotipos 1. 5), las cuales se traducen en diferencias fenotípicas en las colonias de estos serotipos. (Rodríguez Méndez, G. A. 2010).

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

Algunos serotipos muestran similitudes estructurales o tienen cadenas O de LPS iguales, lo que explica la reacción cruzada observada entre los serotipos 1,9 y 11; 3, 6 y 8; y entre 4 y 7. (Romero Hurtado, S. 2010).

Los LPS de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provocan únicamente lesiones leves en los pulmones de porcinos sin mostrar lesiones hemorrágicas ni necróticas, indicando que no son los responsables de las lesiones típicas de la Pleuroneumonía porcina, pero que, si pueden contribuir a su formación, incrementando los efectos producidos por las toxinas Apx. Los LPS también están implicados en la adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a las células y moco de las vías respiratorias porcinas y como mecanismo alterno de la captación de hierro. (Mori Álvarez, L. 2007).

### 1.3.3 Fimbrias

Las fimbrias están presentes en una gran variedad de patógenos y su papel en la adhesión se ha definido, relacionándolas con la adherencia íntima a los alveolos pulmonares y los bronquiolos. (Mori Álvarez, L. 2007). Se ha descrito la presencia de fimbrias 0.5 a 2 nm de diámetro y de 60 a 450 nm de longitud, identificadas por microscopia electrónica. Estas desaparecen en los primeros pasos *in vitro*. (Medrano Muñoz, A. 2003).

### 1.3.4 Proteínas de membrana y Proteínas de unión a transferrina

Los determinantes antigénicos de las proteínas de membrana externa, junto con los de LPS y proteínas citoplasmáticas, son los responsables de la reactividad cruzada entre los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y otras especies, lo que da lugar a problemas de inespecificidad en las pruebas diagnósticas. (Monter Flores, J. L. 2010).

Las proteínas de membrana son importantes en la regulación de proteínas de superficie en respuesta a las condiciones de crecimiento en el medio ambiente. (Idalia Enríquez V. D. 2003). Proteínas comunes a todos los serotipos han sido demostradas como proteínas de 75 KDa que se unen a la hemoglobina del porcino y unas proteínas de 60 KDa responsables de la adherencia al colágeno presente en el pulmón del porcino. (Mori Álvarez, L. 2007).

Dentro de las proteínas de membrana externa, ocupan un lugar destacado las proteínas de unión a transferrina. Este elemento es esencial para el crecimiento bacteriano aunque resulta de difícil acceso, ya que se encuentra acoplado en el medio extracelular con las glucoproteínas del hospedero (transferrina y lactoferrina). Este es el motivo por el cual las bacterias han desarrollado diferentes estrategias dirigidas a la obtención de hierro. Las especies del género de *Actinobacillus* poseen

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

un mecanismo de adquisición de hierro que implica la unión directa de la transferrina del hospedero a receptores proteínicos situados en la superficie del patógeno. (Monter Flores, J. L. 2010) Dichos receptores están contruidos por dos proteínas distintas: Tbp1 o TbpA y Tbp2 o TbpB. (Medrano Muñoz, A. 2003) Estas proteínas presentan unión específica para le región C terminal de la transferrina porcina. (Mori Álvarez, L. 2007)

### 1.3.5 Proteasas

*Actinobacillus pleuropneumoniae* es capaz de secretar proteasas con actividad sobre varios substratos como son la gelatina, la inmunoglobulina A (IgA) y la hemoglobina porcina. (Monter Flores, J. L. 2010)

Las principales proteasas de esta bacteria patógena son metaloproteasas facilitando la invasión de la bacteria a las mucosas del tracto respiratorio del cerdo.

### 1.3.6 Toxinas

Son proteínas con actividad toxica que se secretan durante el proceso infeccioso. Estas toxinas pertenecen a la familia de toxinas Repeats in toxin (RTX) formadoras de poros, con toxicidad hacia los neutrófilos y macrófagos alveolares. (Mori Álvarez, L. 2007). Su denominación actual es de toxinas Apx I, Apx II, Apx III y Apx IV, cuyo patrón fenotípico en su expresión determina el grado de virulencia entre los diferentes serotipos. (Rodríguez Méndez, G. A. 2010). En la tabla 2 se describe la actividad hemolítica citotóxica de cada toxina. (Plonait, H. 2001).

*Tabla 2 Características de toxinas de Actinobacillus pleuropneumoniae (Plonait, H. 2001),*

<b>Toxina</b>	<b>Actividad hemolítica</b>	<b>Actividad citotóxica</b>	<b>Serotipos productores</b>
<b>Apx I</b>	Fuertemente hemolítica	Fuertemente citotóxica	1, 5, 9, 10 y 11
<b>Apx II</b>	Débilmente hemolítica	Débilmente citotóxica	Por todos los serotipos excepto 10 y 14
<b>Apx III</b>	No hemolítica	Fuertemente citotóxica	2,3, 4, 6 , 8 y 15
<b>ApxIV</b>	Débilmente hemolítica	Débilmente citotóxica	Por todos los serotipos, solos se produce in vivo .

En general, las toxinas RTX son codificadas por operones policistrónicos de 4 genes contiguos arreglados en el orden CABD, donde A codifica la pretoxina funcional, C codifica una proteína involucrada en la activación post-traduccional de la pretoxina

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

B y D, codifican las proteínas asociadas a membrana para efectos de secreción específica. (Rodríguez Méndez, G. A. 2010).

### 1.4 Patogenia y mecanismos de evasión del Sistema Inmune.

La infección se da por lo general por aerosoles o por contacto. La adherencia a anillos traqueales y mucosa respiratoria es posible por la acción conjunta de las fimbrias, capsula y LPS. (Romero Hurtado, S. 2010). Durante las primeras horas posteriores a la infección se da un engrosamiento del tabique intralveolar causado por la acumulación de exudado fibrinoso, e infiltración de células inflamatorias.

El establecimiento de la infección depende de la capacidad de la bacteria para obtener todos los elementos necesarios en su desarrollo y crecimiento, produciendo para ello proteínas de membrana externa, TbpA y TbpB.

Los microorganismos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que están en el pulmón son fagocitados con rapidez por macrófagos alveolares, dichos microorganismos producen toxinas Apx I, Apx II y Apx III. las cuales son citotóxicas en diferente grado para los macrófagos, polimorfonucleares (PMNs), células epiteliales del pulmón y células endoteliales. A la vez Apx I y Apx II son hemolíticas. (Ruiz, A. 2011). El microorganismo parece estar protegido de la fagocitosis por su capsula y también puede ser resistente a la acción del complemento. La infección se acompaña de la secreción en el líquido alveolar de citocinas proinflamatorias como interleucina IL-6 y la quimiocina IL-8, y el factor de necrosis tumoral (TNF) también está presente en las lesiones tisulares tempranas. Estas citocinas generan la producción de radicales libres en el medio responsables del daño masivo en la parénquima pulmonar. (Straw, B. S. 2001).

El deterioro generado por las toxinas Apx en el endotelio de vasos sanguíneos pulmonares de pequeño calibre, activa la cascada de coagulación, con la posterior activación de las plaquetas y la formación de microtrombos. De esta manera se generan los procesos de vasculitis, trombosis, edema necrosis y hemorragias características sobre la superficie pulmonar. (Ruiz, A. 2011).

Días posteriores a la infección, las lesiones pulmonares están bien definidas y es posible aislar *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Con la evolución de la lesión comienza un proceso de fibrosis que conduce a la cicatrización. (Mori Álvarez, L. 2007).

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

### 1.5 Formas clínicas

El curso clínico puede ser hiperagudo, agudo o crónico. Las infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae* pueden ser fatales hasta 12 horas después de la exposición del cerdo.

Los signos clínicos incluyen anorexia, fiebre, dificultad respiratoria grave con cianosis, tos y disnea así como la muerte súbita. Es frecuente encontrar exudado nasal caracterizado por la sangre y espuma en animales que presentan la forma aguda de la enfermedad. (Straw, B. S. 2001).

En el curso hiperagudo hay un corto periodo de diarrea leve y vómito, el animal afectado cae al suelo sin signos respiratorios distintivos, el pulso se vuelve más rápido desde muy temprano y se desarrollan insuficiencia cardíaca y respiratoria. La piel de la nariz, orejas, y más tarde todo el cuerpo se vuelve cianótica. En la fase terminal hay una disnea grave con respiración bucal, los animales permanecen en la postura de perro, sentado y la temperatura rectal disminuye en forma marcada. Estudios experimentales demostraron que el curso de la enfermedad puede ser tan corto como de 3 horas desde la infección hasta la muerte. (Straw, B. S. 2011).

En el curso agudo destacan sobre todo la disnea, inapetencia, apatía, fiebre hasta 41 °C, tos intermitente y dolorosa. Sin tratamiento al cabo de pocos días puede producirse la muerte o el paso al curso crónico. (Plonait, H. 2001)

Los cursos sub agudo y crónico se desarrollan generalmente del proceso agudo; y en ellas se manifiestan la tos intermitente, pérdida del apetito y reducción de la velocidad del crecimiento. Las lesiones macroscópicas se evidencian por las áreas de consolidación pulmonar de apariencia nodular de tamaño variable, al corte, se puede observar que los dichos nódulos están compuestos por tejido necrosado al nivel de la pleura, esta parece como una inflamación adhesiva local. (Rodríguez Méndez, G. A. 2010)

### 1.6 Respuesta Inmune

La respuesta humoral, es crucial en la defensa contra la infección con *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La hipótesis de que la IgG es la inmunoglobulina de mayor importancia es apoyada por experimentos de transferencia de suero de porcinos convalecientes, causando títulos de IgG similares a aquellos en porcinos inmunizados.

Debido a que las mucosas son la primera vía de contacto con el microorganismo, el papel de la IgA en la etapa inicial de la infección es importante. La presencia de estas inmunoglobulinas en fluidos nasales y bronqueoalveolares resulta básica para



## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

la opsonización y neutralización de la bacteria, antes de que esta pueda alcanzar las vías respiratorias inferiores

La IgA impide la fijación del antígeno sobre la mucosa, estimula los macrófagos aumentando su actividad fagocitaria. Las segrega las células epiteliales y la superficie de la mucosa, igual que las IgM junto a su componente Fc secretor al que van unidas. Este isotipo de inmunoglobulina no origina ninguna activación del sistema de complemento sobre las mucosas. (Zimmermann, X. 2001).

La IgG solamente tiene dos puntos de unión para los correspondientes antígenos, formando un complejo antígeno-anticuerpo, opsoniza al antígeno y activa la cascada de complemento a través de C o C3; comparada con la IgM, su aparición sobre la mucosa tras una invasión de microorganismos es relativamente tardía.

El sistema de complemento se compone de una serie de proteínas con capacidad reactiva, que se pueden activar mediante la IgM y la IgG de otros factores. La activación se puede producir sobre las mucosas del aparato respiratorio debido a los productos de destrucción de los granulocitos, neutrófilos, y provocar daños en la células endoteliales de los capilares. (Zimmermann, X. 2001).

La inoculación de cerdos con antisuero los protege contra la exposición a la bacteria, indicando que una respuesta inmune sistémica contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* puede jugar un rol en la protección y que la inmunidad mediada por células no es esencial para la protección. Sin embargo, por medio de infecciones experimentales vía aerosol en cerdos con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, se ha observado un incremento del número de linfocitos T (CD4 y CD8) en el tejido linfóide asociado a los bronquios y una concentración elevada de neutrófilos en los lavados pulmonares, que normalmente están ausentes. (García Parreño O. 2007)

### 1.7 Epidemiología

Se han descrito brotes en casi todos los países europeos, en Estados Unidos, en Canadá, México, Sudamérica, Japón. Taiwán y Australia. Dentro de los descritos para *Actinobacillus pleuropneumoniae*, los serotipos 1 y 5 y en menor grado el serotipo 7, son responsables de casi el 95% de los casos clínicos de pleuroneumonía en Norteamérica. (Dennis W. 2005). En México el serotipo 1 es el más frecuente, aunque se han descrito el 3, 5 y 7. (Morilla González, A. 2005).

La principal ruta de diseminación es por aire y la transmisión se da por contacto directo de cerdo a cerdo o por gotitas dentro de cortas distancias. Se considera en general, que la entrada de hembras jóvenes de reemplazo es uno de los puntos clave de la transmisión de la infección. Los lechones que nacen de estos animales son excretores de la bacteria en número superior que los que provienen de hembras

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

más viejas. El agrupamiento de lechones provenientes de distintas maternidades, de las cuales al menos una está infectada, es muchas veces suficiente para provocar una eclosión de la enfermedad. En los sistemas de rotación, la fuente de infección original son las madres que infectan verticalmente los lechones. En el engorde, la introducción constante de animales infectados estimula constantemente la infección. Una vez establecida la infección en el engorde, mismos si los lechones que entran del destete no están más infectados, los animales de más edad portadores mantendrán la infección activa. (M. Gottschalk. 2012).

La sobrevivencia media del *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el ambiente se ha estimado en 30 minutos a 27 grados Celsius. La transmisión entre diferentes planteles se produce por la inducción de animales portadores dentro de poblaciones libres de la enfermedad. (Dennis W. 2005).

### 1.8 Diagnóstico

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

- a) Diagnóstico clínico anatomopatológico, por observación de síntomas y lesiones típicas
- b) El diagnóstico bacteriológico, complementa al anterior, constituyendo el diagnóstico con certeza, pero no discrimina al serotipo actuante en el brote o infección subclínica del animal muestreado.
- c) El diagnóstico serológico es de utilidad para determinar presencia o ausencia de infección a nivel granja o portadores inaparentes. (Zielinski, G. 2006).

Existen distintas pruebas serológicas:

- I) Las que son específicas para serotipo/serogrupo: Usa como antígeno el LPS altamente purificado que puede identificar serotipos o serogrupos que afectan a la granja. Normalmente para reducir los costes, se escogen los serotipos más importantes causantes de los signos clínico en el o los países. (Gottschalk, M. 2014).
  - Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA): LC-LPS ELISA (Morilla González, A. 2005)
  - Aglutinación en tarjeta (Pleurotest) Consiste en la aglutinación del complejo Ag-Ac haciéndolo visible

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

- II) Las que pueden detectar todos los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (sin discriminación entre serotipos): Está basada en Apx IV, una toxina que es específica de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y que solamente se produce in vitro.
- Chekit-APP-Apx IV: La prueba tiene una eficacia del 95% y una especificidad del 99 % (Mori A. L 2010).
- III) Las que pretenden diferenciar una mezcla de serotipos: basados en algunos antígenos comunes. (Gottschalk, M. 2014).

La serotipificación completa usando anticuerpos con una variedad de pruebas serológicas es proporcionada por muy pocos (si los hay) laboratorios de referencia especializados en diferentes países. Además, las reacciones cruzadas observadas con anticuerpos a menudo impiden la correcta identificación de algunos serotipos. Para superar estos problemas, recientemente se han desarrollado varias técnicas moleculares (principalmente PCR). (Gottschalk, M. 2015). Sin embargo, tienen poca disponibilidad y un costo mucho más elevado.

### 1.8.1 Aglutinación

Las técnicas de aglutinación, al igual que otras técnicas inmunológicas, son útiles para la detección de antígenos o de anticuerpos. Se fundamentan en incluir una agrupación macroscópicamente visible de partículas, causada por interacciones antígeno-anticuerpo, que forman puentes entre ellas. Usualmente, el antígeno se encuentra sobre la partícula y los anticuerpos forman los puentes. Pero también pueden utilizarse diseños diferentes, en donde los anticuerpos se encuentran unidos a la superficie de las partículas, y el antígeno forma los puentes. (Lomonte Vigliotti, B. 2007)

1.8.1.1 Tipos de reacciones de aglutinación según las características de las partículas aglutinantes

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

a) Reacciones de aglutinación pasiva: se basan en el empleo de una partícula inerte a la cual se le ha unido un antígeno, por ejemplo, glóbulos rojos con lisado de *T. gondii* para la búsqueda de anticuerpos anti *T. gondii* en sueros humanos.<sup>23</sup>

b) Reacciones de aglutinación activa: se basan en el empleo de la partícula aglutinante como antígeno por ejemplo Bacterias como *Brucella* empleando la reacción de Huddleson para la búsqueda de Ac. Anti-*Brucella* en sueros humanos. (Rajme-Manzur, D. 2017).

### 1.9 Antígeno de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y antígeno de *Brucella*

La técnica para la preparación del antígeno de *Actinobacillus pleuropneumoniae* está basada en el fundamento de dos técnicas para la preparación de antígeno de la bacteria *Brucella*: antígeno de Huddleson y técnica de aglutinación con rosa de bengala. (Rivers, R. 2008).

#### 1.9.1 Antígeno de Huddleson

El antígeno de Huddleson es un reactivo para el diagnóstico *in vitro* de la brucelosis humana y animal, detecta la presencia de anticuerpos IgM e IgG en el suero, mediante la técnica de aglutinación en placa. (M. V. Herrera ,B. 2003).

El antígeno de Huddleson consiste en una suspensión de *Brucella abortus* (estable y de baja virulencia, en fase lisa) en solución fisiológica fenolada (NaCl 0.85 % y fenol 0.5 %) cuya concentración final es de 11% y pH: 6.4-7.0 a la que se le añade una mezcla de Violeta de Genciana y Verde Brillante (6 mL/L de suspensión celular) para obtener una coloración final de antígeno que facilite la visualización de la reacción. (Britania. 2017).

#### 1.9.2 Técnica de aglutinación con Rosa de Bengala

La prueba del Rosa Bengala o prueba del antígeno tamponado de *Brucella*, es una técnica rápida de aglutinación en porta para la detección de anticuerpos anti-*Brucella* en sueros animales y humanos. La suspensión bacteriana es reactiva tanto con anticuerpos IgG como IgM, siendo los primeros detectados más precozmente (infecciones sub-clínicas) y por un período más largo de tiempo (fase crónica). La determinación se efectúa ensayando la suspensión tamponada (pH 3.6 y ajustado a una concentración celular de 8 %.) (Alton, G.G, 1935). de *Brucella* coloreada con Rosa Bengala frente a los sueros problema. La presencia o ausencia de aglutinación visible es indicativa de la presencia o ausencia de anticuerpos en las muestras ensayadas. La aglutinación con Rosa de Bengala es una prueba muy económica y

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

---

con una sensibilidad muy alta del 99%, pero tiene el inconveniente de una especificidad del 40%. Esta prueba es de utilidad en áreas rurales, en donde no es posible llevar a cabo la aglutinación en tubo y en casos en donde es muy importante un tratamiento temprano. (Vega López, C.A. 2008)

Es una prueba de tamizaje, de gran difusión, rápida y económica, Es cualitativa y debido a su bajo pH privilegia la aglutinación de anticuerpos del isotipo IgG (Moral, M. 2013).

### 1.10 Control y tratamiento

En las granjas infectadas, es posible mantener la infección bajo control y que la enfermedad no sea clínicamente importante. La introducción de animales de reemplazo es un punto crítico, ya que es uno de los aspectos que puede mantener la infección muy activa en la maternidad. En general se recomienda que todas las hembras de reposición permanezcan en una nave de cuarentena, sobre todo si son compradas fuera de la granja. En dicha nave, los animales se pueden inmunizar mediante vacunas (idealmente) o por infección natural. (M. Gottschalk. 2012).

Cuando la enfermedad clínica aparece, urge controlarla para reducir las pérdidas por mortalidad. En los casos de la enfermedad muy aguda, uno de los aspectos más importantes es la identificación de los signos clínicos muy temprano. Las decisiones que tomar son el tipo de medicamento a utilizar y la vía de administración. Para que sea eficaz, el tratamiento debe instaurarse desde el principio de la enfermedad, apenas aparecen los signos clínicos. En los casos hiperagudos, todos los animales deben tratarse individualmente por vía parenteral. En los casos menos agudos, y cuando los animales todavía pueden desplazarse, puede intentarse un tratamiento global en el agua, aunque existe siempre el riesgo que los niveles de antibiótico en ciertos animales no sea el indicado por bajo consumo. (M. Gottschalk. 2012).

Para la elección del antibiótico es importante tener el resultado de un antibiograma para asegurar una buena respuesta clínica. Una gran variedad de antibióticos es utilizados como penicilina, tetraciclina, estreptomina, sufaclopiridacina timetroprima, lincomicina, entre otros. (Salazar- F. 2001).

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

### 2.0 Objetivos

#### 2.1 Objetivo principal

Contribuir en el diagnóstico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* al producir antígenos de App a una concentración del 5 % mediante la obtención de biomasa por centrifugación de caldo PPLO inoculado previamente con dicha bacteria y posterior tinción con rosa de Bengala de serotipos 1, 3, 5 y 7 para su posterior aplicación en la técnica de aglutinación en placa.

#### 2.2 Objetivos particulares.

Evaluar Antígenos en muestras de sueros de cerdos y compararlos con Antígenos estandarizados mediante reacción de aglutinación en placa con la finalidad de comprobar la calidad del antígeno obtenido.

Apoyar en el laboratorio de Virología en la detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y así favorecer el desarrollo de otros proyectos.

### 3.0 Justificación

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) es el agente etiológico de la Pleuroneumonía Porcina, de evolución y difusión muy rápidas y en muchos casos mortal, afecta a cerdos en las diferentes etapas de su crecimiento, pero especialmente a los cerdos jóvenes, La infección es muy frecuente y de alta tasa de mortalidad. Se trata de una enfermedad de considerable importancia económica por las muertes que ocasiona, los tratamientos que precisa y los efectos de las formas crónicas. El interés del presente proyecto es apoyar a la detección del microorganismo mediante la producción de un antígeno de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en los serotipos 1, 3, 5 y 7 y posteriormente ser empleado en la técnica de aglutinación en placa, la cual, a pesar de la amplia gama de herramientas para el diagnóstico que existen, tiene las ventajas de tener una alta disponibilidad, ser fácil de realizar y tener un costo muy bajo en comparación con otras técnicas.

#### 4.0 Materiales y método

##### 4.1 Lugar de trabajo

La totalidad del proceso para la producción del antígeno se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Virología y microbiología de las enfermedades respiratorias del cerdo en el edificio de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

##### 4.2 Muestras y cepas

Las cepas empleadas para la producción del antígeno así como las muestras de sueros de cerdos, que fueron recolectadas de distintas granjas de México, fueron proporcionadas por el laboratorio en el que se realizó el presente trabajo.

##### 4.3 Producción de biomasa

Para la producción de biomasa se preparó Agar PPLO, enriquecido con solución stock de NAD al 0.5 %. Cada cepa de APP de los distintos serotipos (1, 3, 5 y 7) fue sembrada en 2 placas de Agar PPLO. Incubadas posteriormente a 37°C por 24 horas. Se realizaron pruebas primarias a colonias obtenidas en dichas placas de PPLO. Posteriormente se prepararon 350 ml de caldo PPLO enriquecidos con solución stock, inoculados a partir de cepas obtenidas en placas de agar PPLO, se incubó durante 24 horas a 37°C con agitación. Se prepararon 8 litros de caldo PPLO, añadiendo 24 ml de sol stock, NAD AL 0.5 %. Finalmente, los 8 litros de caldo fueron inoculados con caldos PPLO (350 ml) e incubados durante 24 horas a 37°C con agitación. Obteniendo así 8 litros por cada serotipo

##### 4.4 Inactivación

Se inactivó el caldo PPLO (8 litros) agregando formaldehído en una concentración de 0.5% manteniendo en agitación durante 30 min.

##### 4.5 Acondicionamiento

Se centrifugaron los 8 litros de caldo a 5000 rpm por 30 min, recuperando el sedimento. (Biomasa). Se añadió a Biomasa obtenida solución purificadora cubriéndola en su totalidad.

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

---

Se dejó en refrigeración por 24 horas. El volumen total obtenido de biomasa con solución purificadora fue medido y se realizó un procedimiento similar al microhematocrito empleando un lector para calcular gramos obtenidos de biomasa.

La biomasa fue teñida realizando cálculos para obtener cantidades de solución salina fenolada y rosa de bengala a partir de lo siguiente:

Por cada gramo de biomasa obtenida se añadieron 22.5 mL de solución salina fenolada

Por cada 35 mL de solución salina fenolada empleada se agregó 1 mL de rosa de bengala

Centrifugar y licuar con solución salina fenolada para retirar excedente de colorante hasta obtener un sobrenadante transparente.

### 4.6 Ajuste de concentración

Resuspender biomasa en buffer de lactatos con pH de 3.65 de manera que la concentración final sea del 5% (% biomasa/volumen) de acuerdo a la siguiente formula

- $\% 5 = \frac{\text{Biomasa obtenida (g)}}{\text{volumen de buffer de lactatos (mL)}} \times 100$

Despejando volumen de buffer en la formula se obtiene:

- $\text{volumen de buffer de lactatos (mL)} = \frac{\text{Biomasa obtenida (g)}}{(100\%)/5\%}$

Se realizó nuevamente la técnica similar al microhematocrito para verificar. Puesto que la concentración no era la indicada, se ajustó volumen Se centrifugo para retirar el exceso de volumen de buffer y se resuspendió nuevamente.

### 4.7 Prueba con sueros de cerdos

Para evaluar la calidad del antígeno resultante, se realizaron pruebas de aglutinación en placa, empleando muestras de sueros de cerdos procedentes de 6 diferentes granjas de México: Granja ABC, Guanajuato, Herradura, Ramari, La loma Jalisco y El llano Guanajuato. Primero se realizaron pruebas con un antígeno ya estandarizado proporcionado por el laboratorio, es decir Antígeno A o antígeno evaluador. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento usando esta vez el antígeno obtenido o Antígeno B (Antígeno Evaluado). Ambos resultados fueron contrastados, registrando en tablas y en graficas el número de muestras, las cuales



## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

varían de granja en granja, y el porcentaje de muestras positivas obtenidas tanto por Antígeno A como por Antígeno B

### *5.0 Resultados*

#### 5.1 Resultados primer ensayo

Los resultados de gramos de Biomasa, fueron obtenidos mediante la técnica similar al hematocrito, partiendo de este dato se calcularon los mililitros de solución fenolada necesaria para la tinción tomando en cuenta que se requieren 22.5 ml de dicha solución por gramo de biomasa. (Ver tabla 3)

*Tabla 3 : Gramos obtenidos de biomasa y mililitros de solución fenolada por serotipo.*

<b>Serotipo</b>	<b>Biomasa (gr)</b>	<b>Solución fenolada (ml)</b>
<b>App 1</b>	6.323	142.26
<b>App 3</b>	8.545	192.26
<b>App 5</b>	7.465	167.96
<b>App 7</b>	4.22	94.95

Partiendo de la tabla 3 y tomando en cuenta que se requiere 1 ml de rosa de bengala por 35 ml de solución fenolada para la tinción, se realizaron los cálculos para obtener los mililitros necesarios del colorante por serotipo. (Ver tabla 4)

*Tabla 4 Mililitros de solución fenolada y rosa de Bengala necesarios para tinción por serotipo.*

<b>Serotipo</b>	<b>Solución fenolada (ml)</b>	<b>Rosa de bengala (1 ml)</b>
<b>App 1</b>	142.26	4.064
<b>App 3</b>	192.26	5.49
<b>App 5</b>	167.96	4.798
<b>App 7</b>	94.95	2.712

Para retirar exceso de colorante hasta obtener un sobrenadante transparente se realizaron constantes lavados mediante centrifugación.

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

*Tabla 5 Numero de lavados realizados por serotipo.*

Serotipo	Numero de lavados
App 1	21
App 3	29
App 5	15
App 7	15

Una vez que se obtuvo la biomasa teñida, se rehidrato con buffer de lactatos. Cabe mencionar que la mayor parte del proceso para producir la biomasa se llevó a cabo en tubos de centrifuga, por lo tanto se añadió una cantidad de 10 mililitros aproximada por cada tubo que se tenía de biomasa por serotipo, (los mililitros totales de buffer empleados por serotipo están registrados en la tabla 6) se resuspendió y se realizó el procedimiento similar a hematocrito, el cual resultado de 4% en los 4 serotipos.

Para ajustar la concentración a 5% se empleó la formula porcentaje masa/ volumen, obteniendo los gramos finales de biomasa por serotipo y la cantidad de buffer necesaria para llegar a la concentración de 5%, que resulta a su vez, la cantidad en mililitros del antígeno final.

*Tabla 6 Cálculos ajuste de concentración con Buffer de Lactatos*

Serotipo	App 1	App 3	App 5	App 7
<b>Hematocrito resultante</b>	4 %	4 %	4 %	4%
<b>Gramos obtenidos de biomasa</b>	4 ml $\%=(X)(100\%)/62$ X= 2.48 gr	4 ml $\%=(X)(100\%)/60$ X=2.4 gr	50 ml $\%=(x)(100\%)/50$ X=2.0 gr	4 ml $\%=(X)(100\%)/52$ X=2.08
<b>Hematocrito a ajustar</b>	5 %	5 %	5 %	5 %
<b>Mililitros de buffer de (MI de Antígeno obtenidos)</b>	$5\%=(2.48)(100)/X$ X=49.6 ml	$5\%=(2.4)(100)/X$ X=48 ml	$5\%=(2.0)(100\%)/X$ X=40 ml	$5\%=(2.08)100\%/X$ X=41.6 ml

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

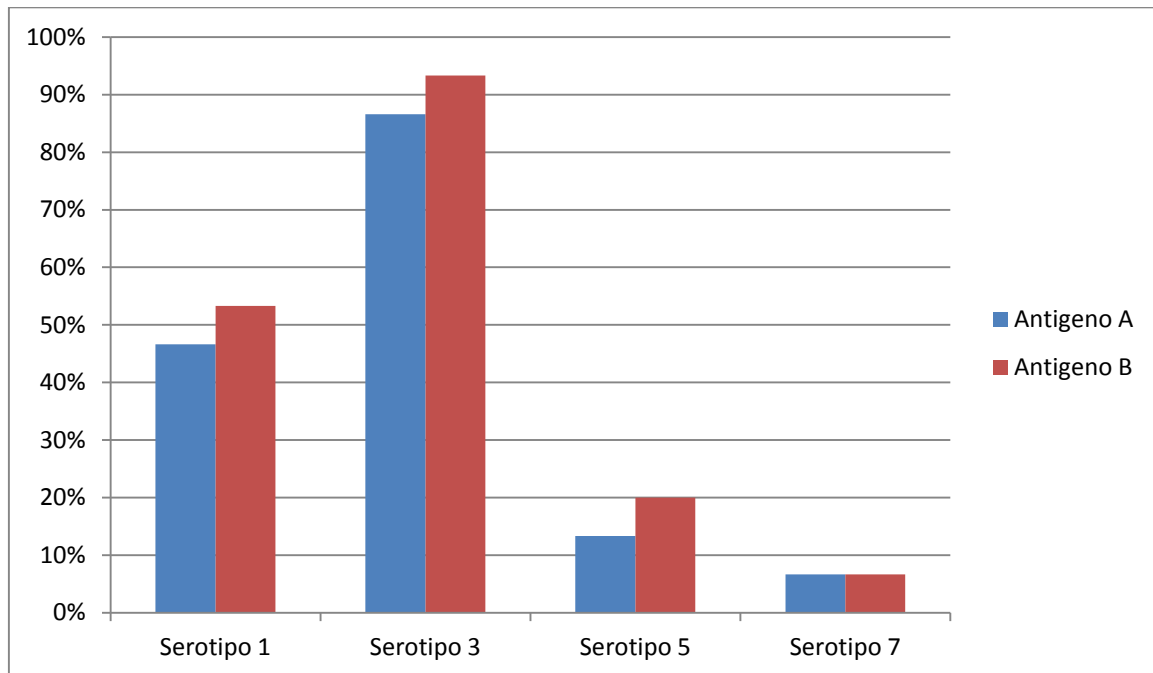
### 5.3 Resultados aglutinación en placa primer ensayo

#### GRANJA ABC

De granja ABC, se emplearon 15 muestras, las cuales fueron evaluadas con Ambos Antígenos (A y B) en los 4 serotipos. Se muestran los porcentajes resultantes por serotipo en tabla 7 y grafica 1 donde es posible observar una diferencia en la cantidad de muestras marcadas como positivas del antígeno ya estandarizado (Antígeno A) en los serotipos 1,3 y 5 en comparación con el realizado (Antígeno B). Para el serotipo 7 el resultado fue positivo en la misma cantidad de muestras.

*Tabla 7 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 15 muestras por serotipo de granja ABC.*

	ANTIGENO A		ANTIGENO B	
	MUESTRAS POSITIVAS	%MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	%MUESTRAS POSITIVAS
<b>SEROTIPO 1</b>	7	46.6	8	53.3
<b>SEROTIPO 3</b>	13	86.6	14	93.3
<b>SEROTIPO 5</b>	2	13.3	3	20
<b>SEROTIPO 7</b>	1	6.6	1	6.6



*Ilustración 1 Porcentajes de muestras positivas de Antígeno A contra porcentajes de muestras positivas de Antígeno B por serotipo de granja ABC.*

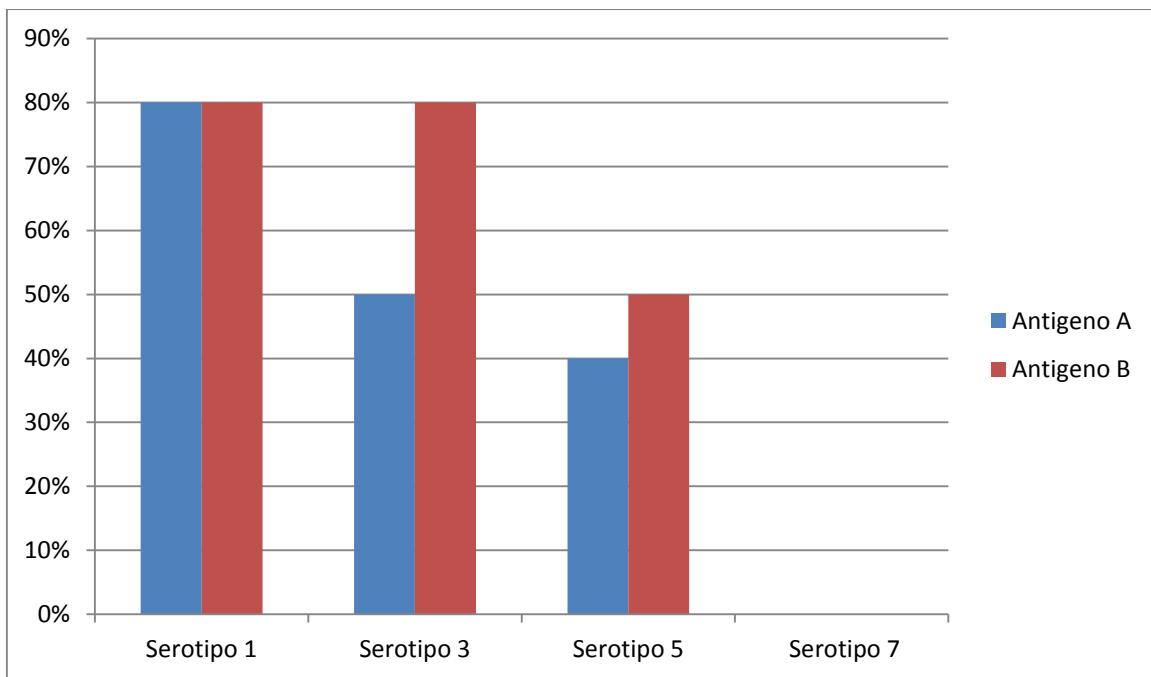
## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

### GRANJA GUANAJUATO

De Granja Guanajuato, se trabajaron 10 muestras, realizando el ensayo con ambos antígenos por serotipo. Los porcentajes se observan en tabla 8 y grafica 2, en las cuales es posible apreciar la diferencia de cantidad de muestras positivas en serotipos 3 y 5. En cuanto a serotipo 1 se obtuvieron las mismas muestras positivas con ambos antígenos. Finalmente, para serotipo 7 es nula la seropositividad tanto con antígeno A como con antígeno B.

*Tabla 8 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 10 muestras por serotipo de granja Guanajuato.*

	ANTIGENO A		ANTIGENO B	
	MUESTRAS POSITIVIAS	% POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	% POSITIVAS
<b>SEROTIPO 1</b>	8	80	8	80
<b>SEROTIPO 3</b>	5	50	8	80
<b>SEROTIPO 5</b>	4	40	5	50
<b>SEROTIPO 7</b>	0	0	0	0



*Ilustración 2 Porcentajes de muestras positivas de Antígeno A contra porcentajes de muestras positivas de Antígeno B por serotipo de granja Guanajuato..*

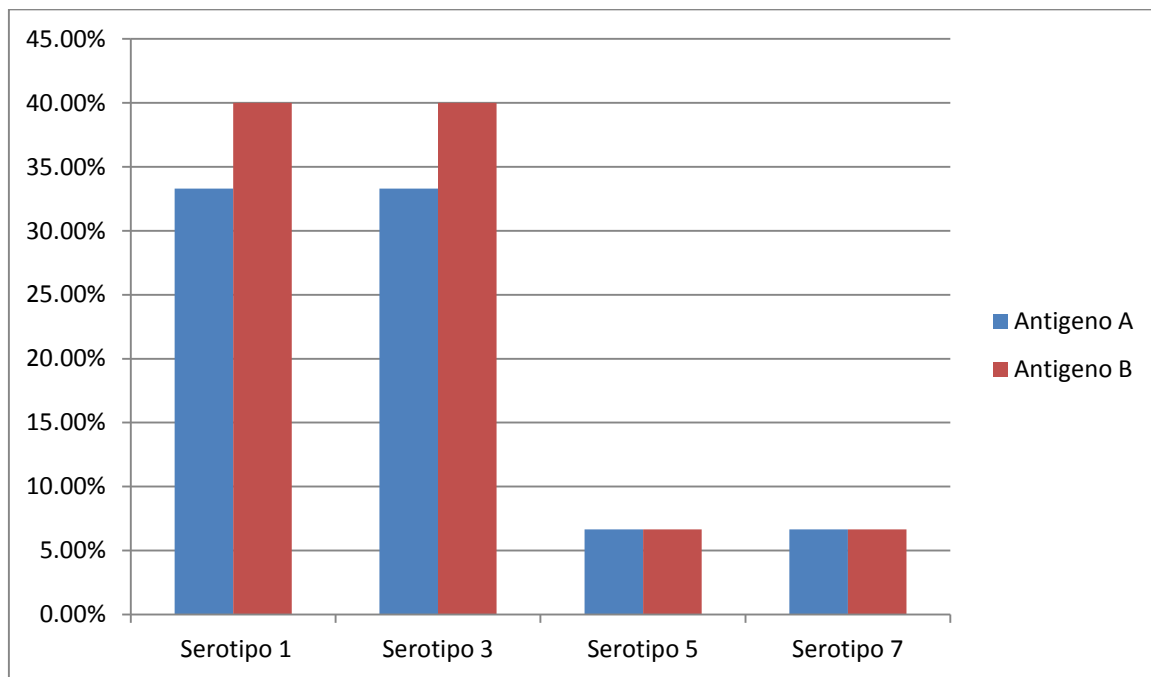
## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

### GRANJA HERRADURA

Para granja Herradura se ensayaron 15 muestras, de igual forma comparando resultados obtenidos por Antígeno A y Antígeno B por cada serotipo. Los datos son mostrados en tabla 9 y gráfica 3, los cuales muestran diferencias en cantidades de muestras positivas en serotipos 1 y 3. Sin embargo en serotipos 5 y 7 se obtuvieron la misma cantidad de muestras positivas con ambos antígenos.

*Tabla 9 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 15 muestras por serotipo de granja Herradura.*

	<b>ANTIGENO A</b>		<b>ANTIGENO B</b>	
	<u>MUESTRAS POSITIVAS</u>	<u>%MUESTRAS POSITIVAS</u>	<u>MUESTRAS POSITIVAS</u>	<u>% MUESTRAS POSITIVAS</u>
<b>SEROTIPO 1</b>	5	33.3	6	40
<b>SEROTIPO 3</b>	5	33.3	6	40
<b>SEROTIPO 5</b>	1	6.6	1	6.6
<b>SEROTIPO 7</b>	1	6.6	1	6.6



*Ilustración 3 . Porcentajes de muestras positivas de Antígeno A contra porcentajes de muestras positivas de Antígeno B por serotipo de granja Herradura*

***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.***

---

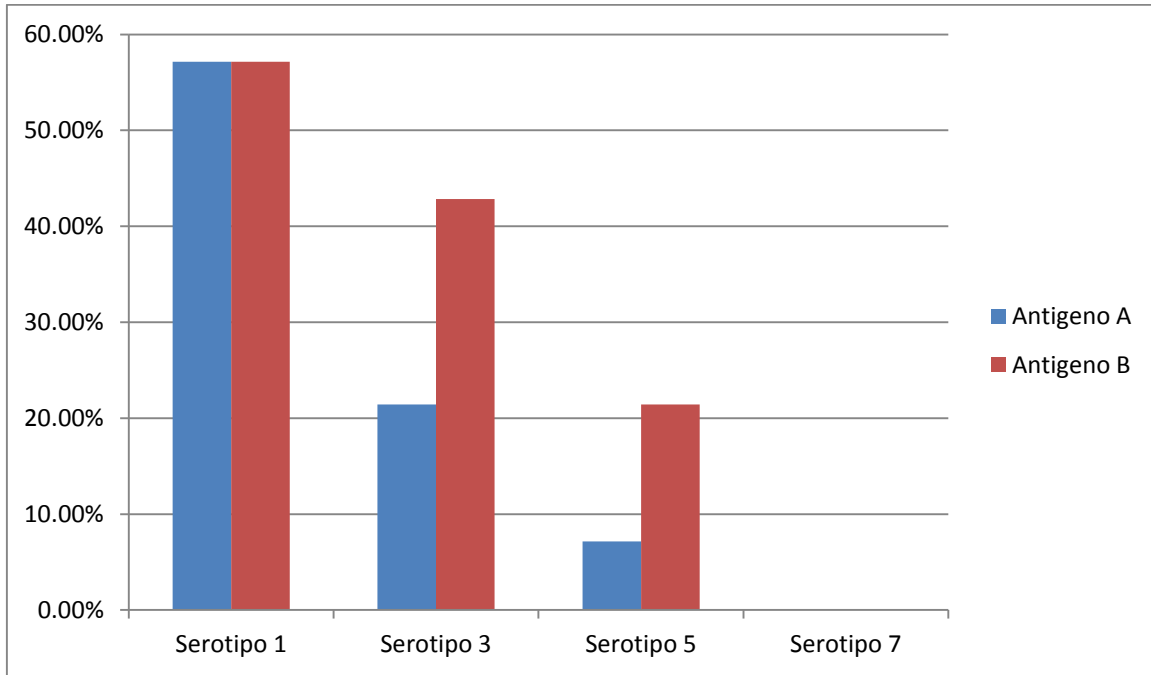
**GRANJA RAMARI**

De granja Ramari se probaron 14 muestras, evaluadas con Antígeno A y Antígeno B en los 4 serotipos respectivamente. La tabla 10 y grafica 4 muestran los resultados en porcentajes, reflejando la diferencia en cuanto a muestras positivas ensayadas con ambos antígenos en serotipos 3 y 5. Por otra parte, en serotipo 1 se obtuvieron 8 muestras positivas ensayadas con antígeno A tanto como con antígeno B. Para serotipo 7 se observa una nula seropositividad con ambos antígenos.

*Tabla 10 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 14 muestras por serotipo de granja Ramari.*

	<b>ANTIGENO A</b>		<b>ANTIGENO B</b>	
	<b>MUESTRAS POSITIVAS</b>	<b>%MUESTRAS POSITIVAS</b>	<b>MUESTRAS POSITIVAS</b>	<b>%MUESTRAS POSITIVAS</b>
<b>SEROTIPO 1</b>	8	57.14	8	57.14
<b>SEROTIPO 3</b>	3	21.42	6	42.85
<b>SEROTIPO 5</b>	1	7.14	3	21.42
<b>SEROTIPO 7</b>	0	0	0	0

***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.***



*Ilustración 4 . Porcentajes de muestras positivas de Antígeno A contra porcentajes de muestras positivas de Antígeno B por serotipo de granja Ramari.*

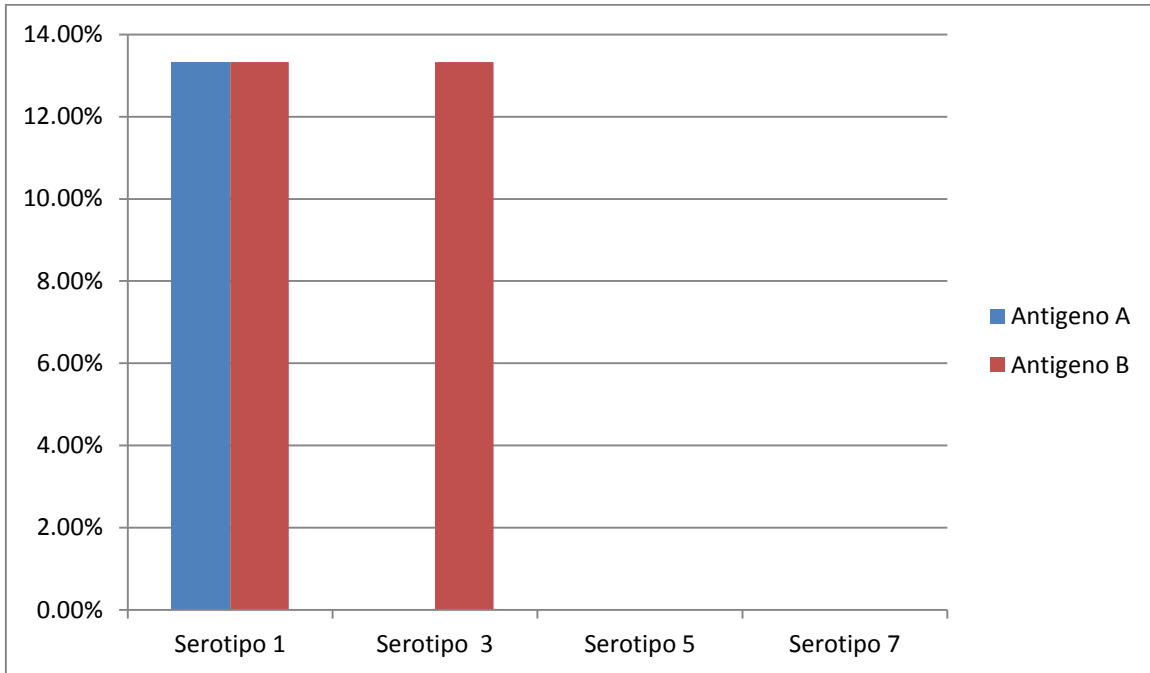
**GRANJA LA LOMA JALISCO**

De la granja La loma Jalisco se ensayaron 15 muestras, de igual forma, con Antígeno A y B, en los 4 serotipos. Los porcentajes se registraron en tabla 11 y grafica 5, los cuales muestran una la misma cantidad de muestras positivas en serotipo 1, para serotipo 5 y 7 todas las muestras resultaron negativas con ambos antígenos. En cuanto a serotipo 3 se obtuvieron 2 muestras positivas con antígeno B mientras que con antígeno A todas las muestras resultaron negativas

*Tabla 11 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 15 muestras por serotipo de granja La Loma Jalisco.*

	ANTIGENO A		ANTIGENO B	
	MUESTRAS POSITIVAS	%MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	%MUESTRAS POSITIVAS
<b>SEROTIPO 1</b>	2	13.3	2	13.3
<b>SEROTIPO 3</b>	0	0	2	13.3
<b>SEROTIPO 5</b>	0	0	0	0
<b>SEROTIPO 7</b>	0	0	0	0

***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.***



*Ilustración 5 Porcentajes de muestras positivas de Antígeno A contra porcentajes de muestras positivas de Antígeno B por serotipo de granja La Loma Jalisco.*

**GRANJA EL LLANO GUANAJUATO**

Finalmente, la granja El llano Guanajuato refería 11 muestras, evaluadas de igual forma. Sin embargo, los resultados obtenidos, tanto por Antígeno A como por antígeno B, registraron cero muestras positivas en los 4 serotipos, reportando esto como Negativo en tabla 12 .

*Tabla 12 Comparación de Antígeno A y Antígeno B en relación al número y porcentaje de muestras positivas de un total de 12 muestras por serotipo de granja El llano Guanajuato.*

	ANTIGENO A		ANTIGENO B	
	MUESTRAS POSITIVAS	%MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	%MUESTRAS POSITIVAS
<b>SEROTIPO 1</b>	-	-	-	-
<b>SEROTIPO 3</b>	-	-	-	-
<b>SEROTIPO 5</b>	-	-	-	-
<b>SEROTIPO 7</b>	-	-	-	-

**5.4 Resultados segundo ensayo (solo con serotipos 1 y 3)**

Puesto que se obtuvo una diferencia significativa al momento de comparar resultados obtenidos contra los resultados esperados en serotipos 1 y 3, (variación que no fue tan notoria en serotipos 5 y 7) se realizó un segundo ensayo, siguiendo



## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

el mismo procedimiento únicamente cambiando en cepas empleadas y ajustando la cantidad de lavados realizados para la tinción.

De igual forma se calcularon los gramos de biomasa mediante el procedimiento similar a hematocrito y se realizaron los cálculos para obtener los mililitros de solución fenolada necesaria. (22.5 ml de solución salina fenolada por gramo de biomasa), Los resultados se observan en tabla 13.

*Tabla 13 Gramos biomasa y mililitros de solución fenolada para serotipo 1 y 3.*

Serotipo	Biomasa (gr)	Solución fenolada (ml)
App 1	10.2	229.5
App 3	8.56	192.6

Partiendo de la tabla 13 de igual forma, se calcularon los ml de rosa de bengala necesarios para la tinción (1 ml de rosa de bengala por 35 ml de solución fenolada) mostrando los resultados en tabla 14.

*Tabla 14 Cálculos Rosa de Bengala*

Serotipo	Solución fenolada (ml)	Rosa de bengala (1 ml)
App 1	229.5	6.55
App 3	192.6	5.50

El número de lavados fue ajustado al mismo número de lavados que fueron aplicados en el primer ensayo para serotipo 5 y 7 , reduciéndose así a 15 lavados, cabe mencionar que el sobrenadante solo presentaba un ligero grado de turbidez hasta esta cantidad de lavados.

*Tabla 15 Numero de lavados realizados para serotipo 1 y 3.*

Serotipo	Numero de lavados
App 1	12
App 2	12

***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.***

---

De igual forma, todo el procedimiento se llevó a cabo en tubos de centrifuga, a los cuales se les añadió 10 ml de buffer aproximadamente por cada tubo que se tenía de serotipo. Se resuspendió y realizo hematocrito resultando nuevamente de 4%. Para ajustar concentración, en la formula porcentaje peso- volumen se empleó el resultado de 4% para calcular los gramos obtenidos de biomasa, de esta manera, al sustituir en la misma fórmula se obtienen los mililitros de buffer necesarios para tener una concentración de 5% (Tabla 16)

*Tabla 16 : Cálculos ajuste de concentración con Buffer de Lactatos*

<b>Serotipo</b>	<b>App 1</b>	<b>App 3</b>
<b>Hematocrito resultante</b>	4 %	4 %
<b>Gramos obtenidos de biomasa</b>	$4\% = (X)(100\%) / 127 \text{ ml}$	$4\% = (X)(100\%) / 107 \text{ ml}$
<b>Hematocrito a ajustar</b>	X= 5.08 gr	X=4.28 gr
<b>Mililitros Antígeno obtenidos</b>	5 %	5 %
	$5\% = (5.08)(100) / X$	$5\% = (4.28)(100) / X$
	X=101.6 ml	X=85.6 ml

### 5.5 Resultados aglutinación en placa segundo ensayo

Para verificar si los cambios en la metodología arrojan cambios, se realizaron una vez ensayos de aglutinación en placa, empleando el Antígeno nuevo, nombrado Antígeno B2, en serotipos 1 y 3. Las muestras empleadas fueron los mismos sueros de cerdos, procedentes de las 6 granjas. Los resultados fueron comparados con los del primer ensayo.

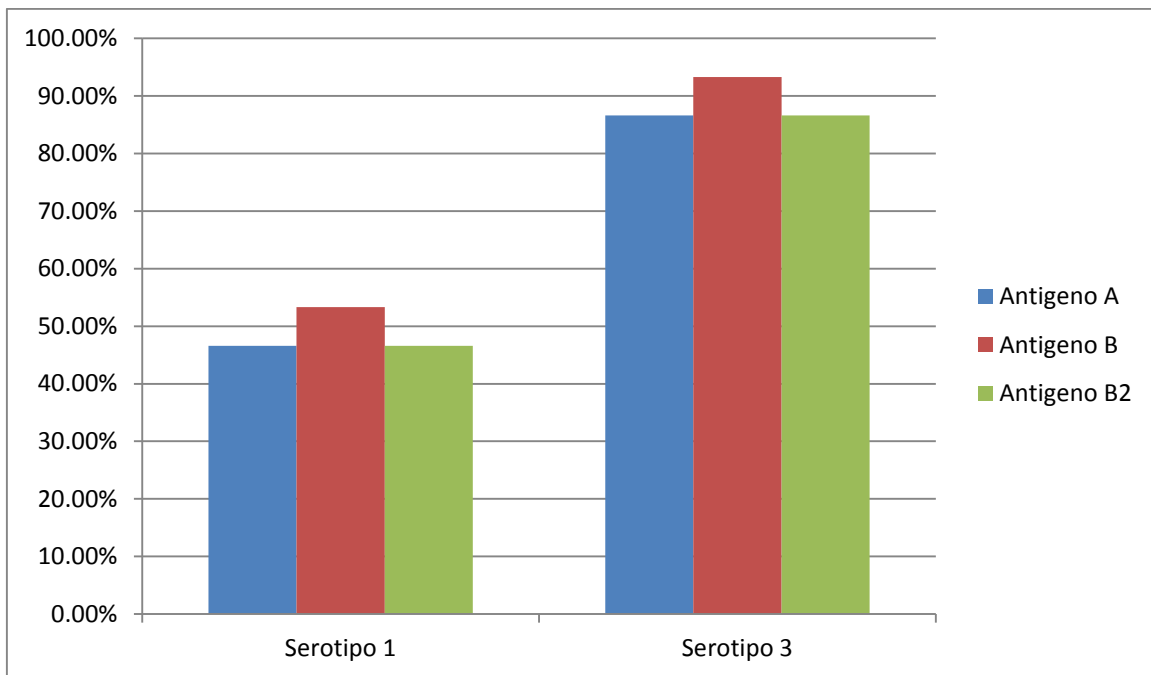
#### GRANJA ABC

De granja ABC, se ensayaron 15 muestras usando Antígeno B2 en serotipos 1 y 3. Los resultados se muestran en la tabla 17 y grafica 7 junto con los resultados de primer ensayo.

***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.***

*Tabla 17 Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 15 muestras por serotipos 1 y 3 de granja ABC.*

	ANTIGENO A		PRIMER ENSAYO		SEGUNDO ENSAYO	
	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS
<b>SEROTIPO 1</b>	7	46.6	8	53.3	7	46.6
<b>SEROTIPO 3</b>	13	86.6	14	93.3	13	86.6



*Ilustración 6 Porcentajes de muestras positivas con Antígeno A, Antígeno B (primer ensayo) y Antígeno B2 (segundo ensayo) de granja ABC.*

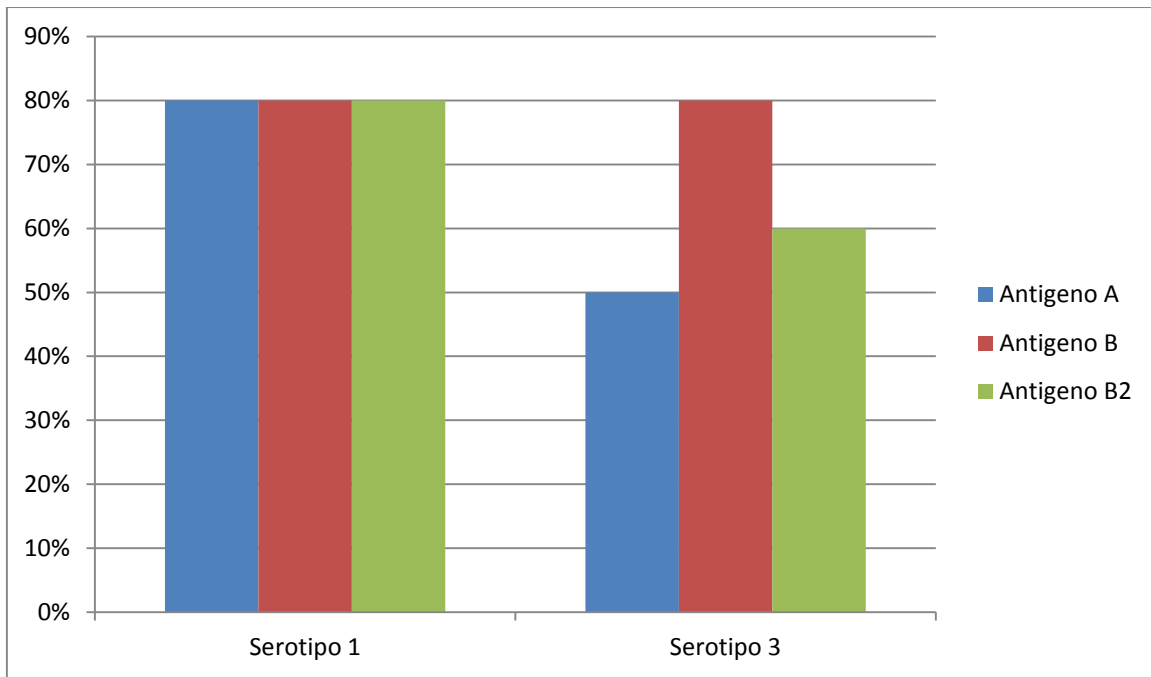
**GRANJA GUANAJUATO**

De igual forma, se realizó aglutinación con las 10 muestras de granja Guanajuato empleando Antiguo B2 en serotipos 1 y 3. Los resultados se encuentran en tabla 18 y 8 gráfica junto con los resultados de primer ensayo.

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

*Tabla 18 . Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 10 muestras por serotipos 1 y 3 de granja Guanajuato.*

	ANTIGENO A		PRIMER ENSAYO		SEGUNDO ENSAYO	
	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	ANTIGENO B MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	ANTIGENO B2 MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS
<b>SEROTIPO 1</b>	8	80	8	80	8	80
<b>SEROTIPO 3</b>	5	50	8	80	6	60



*Ilustración 7 Porcentajes de muestras positivas con Antígeno A , Antígeno B (primer ensayo) y Antígeno B2 (segundo ensayo) de granja Guanajuato.*

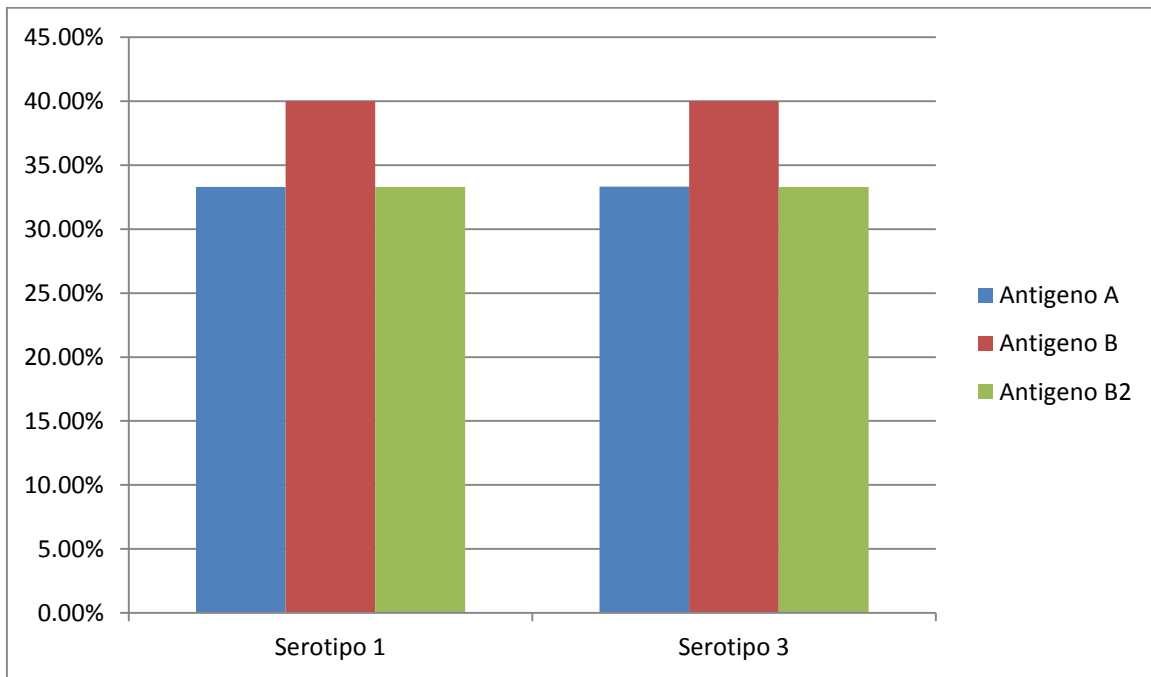
***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.***

**GRANJA HERRADURA**

En granja Herradura se trabajó con 15 muestras, los resultados de aglutinación en placa con Antígeno B2 en serotipos 1 y 3 están registrados en tabla 19 y grafica 9 junto con resultados de ensayo 1.

*Tabla 19 Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 15 muestras por serotipos 1 y 3 de granja Herradura.*

	ANTIGENO A		PRIMER ENSAYO ANTIGENO B		SEGUNDO ENSAYO ANTIGENO B2	
	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS
<b>SEROTIPO 1</b>	5	33.3	6	40	5	33.3
<b>SEROTIPO 3</b>	5	33.3	6	40	5	33.3



*Ilustración 8 Porcentajes de muestras positivas con Antígeno A , Antígeno B (primer ensayo) y Antígeno B2 (segundo ensayo) de granja Herradura.*

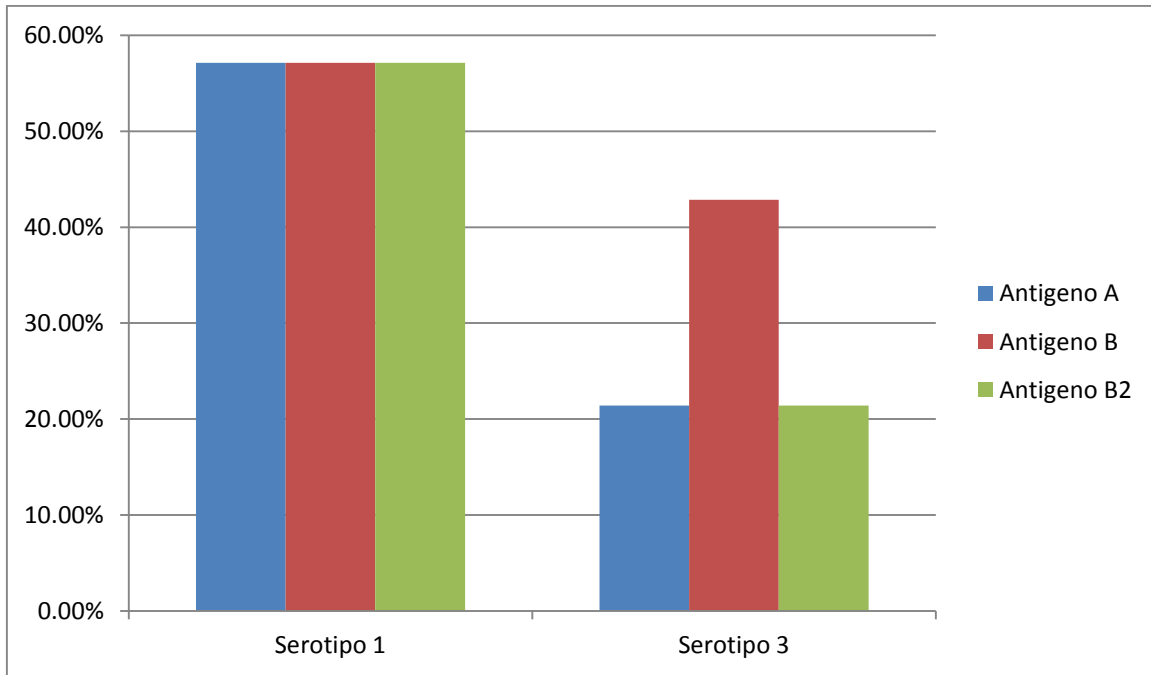
*Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

**GRANJA RAMARI**

En granja Ramari se trabajó con 14 muestras, los resultados de aglutinación en placa con Antígeno B2 en serotipos 1 y 3 están registrados en tabla 20 y grafica 10 junto con resultados de ensayo 1.

*Tabla 20. Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 14 muestras por serotipos 1 y 3 de granja Ramari.*

	ANTIGENO A		PRIMER ENSAYO ANTIGENO B		SEGUNDO ENSAYO ANTIGENO B2	
	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS
<b>SEROTIPO 1</b>	8	57.14	8	57.14	8	57.14
<b>SEROTIPO 3</b>	3	21.42	6	42.85	3	21.42



*Ilustración 9 Porcentajes de muestras positivas con Antígeno A , Antígeno B (primer ensayo) y Antígeno B2 (segundo ensayo) de granja Ramari.*

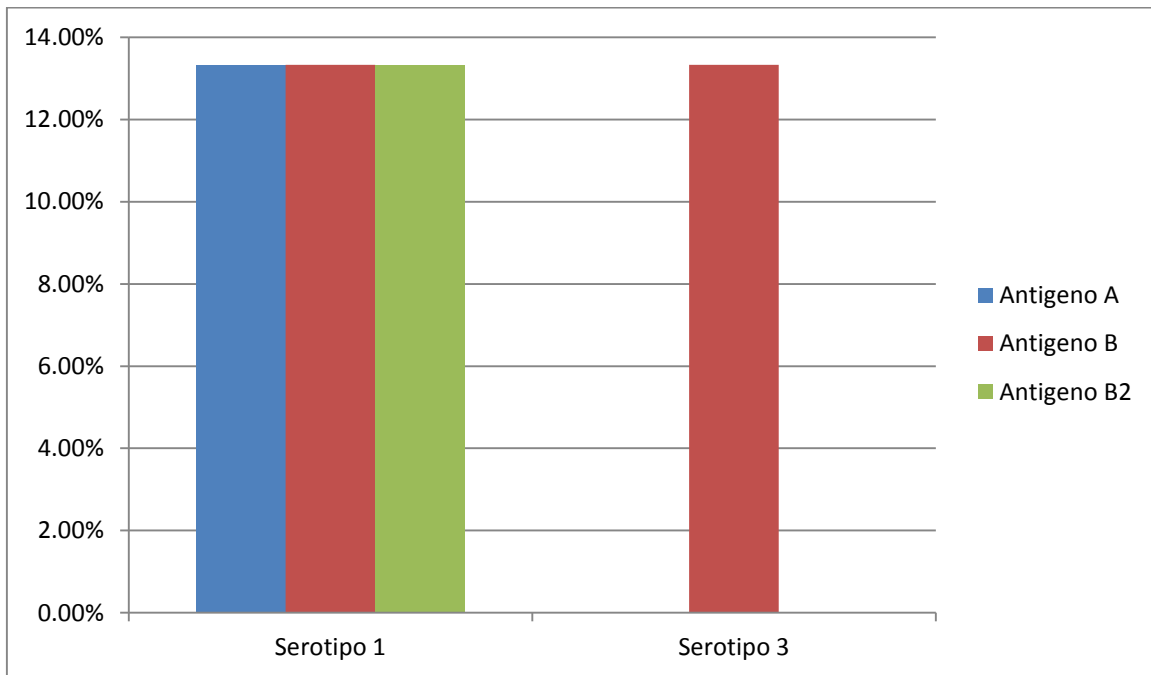
***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.***

**GRANJA LA LOMA JALISCO**

En granja La loma Jalisco se trabajó con 15 muestras, los resultados de aglutinación en placa con Antígeno B2 en serotipos 1 y 3 están registrados en tabla 21 y grafica 11 junto con resultados de ensayo 1.

*Tabla 21 Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 15 muestras por serotipos 1 y 3 de granja La loma Jalisco.*

	ANTIGENO A		PRIMERO ENSAYO		SEGUND ENSAYO	
	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	ANTIGENO B MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	ANTIGENO B2 MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS
<b>SEROTIPO 1</b>	2	13.33	2	13.33	2	13.33
<b>SEROTIPO 3</b>	0	0	2	13.33	0	0



*Ilustración 10 Porcentajes de muestras positivas con Antígeno A , Antígeno B (primer ensayo) y Antígeno B2 (segundo ensayo) de granja La Loma Jalisco.*

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

### GRANJA EL LLANO GUANAJUATO

Para la granja El llano Guanajuato, a pesar de que los resultados iniciales fueron negativos, tanto con Antígeno A como con Antígeno B, se realizó el ensayo con Antígeno B2, esto con el propósito de verificar la calidad del nuevo antígeno. Los datos obtenidos una vez mas fueron negativos y se reportaron en la tabla 22 .

*Tabla 22 Comparación primer ensayo muestras positivas con antígenos A y B contra segundo ensayo muestras positivas con antígeno B2 en 11 muestras por serotipos 1 y 3 de granja El llano Guanajuato.*

	ANTIGENO A		PRIMER ENSAYO ANTIGENO B		PRIMER ENSAYO ANTIGENO B2	
	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS	MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS
	<b>SEROTIPO 1</b>	-	-	-	-	-
<b>SEROTIPO 3</b>	-	-	-	-	-	-

### 6.0 Discusión

La producción de biomasa se realizó mediante la siembra de los distintos serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el medio de cultivo PPLO enriquecido de acuerdo con Gottschalk <sup>31</sup> con Nicotinamida adenina dinucleótido, obteniendo colonias redondas, pequeñas, lisas brillantes de color gris blanquecino.

De igual forma el caldo PPLO fue enriquecido con NAD. Las concentraciones de reactivos y procedimiento en general que se estableció en el presente trabajo fue el descrito por G.G. Alton <sup>30</sup>

Para el primer ensayo, posterior a la tinción y para retirar el colorante fueron necesarios lavados constantes, registrando 21 lavados para serotipo 1, 29 lavados para serotipo 3, 15 para 5 y 7.

Los datos resultantes de la aglutinación en placa pueden verse reflejados en los gráficos, llamando al antígeno ya estandarizado o antígeno evaluador como Antígeno A (Ag A) y al antígeno evaluado como antígeno B (Ag B).



## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

---

Al momento de graficar se observan el número de muestras que resultaron positivas con Antígeno B comparadas con Antígeno A, es decir, para el ensayo 1 se obtuvieron más muestras positivas con Ag B en comparación con Ag A; a lo cual pueden establecerse 3 posibles causas para explicar esta diferencia. Primera: una falla en el procedimiento, segunda una posible reacción cruzada y tercera: un error al momento de lectura de aglutinación.

Para explicar la primera posible causa, el error en el procedimiento puede centrarse en el momento de siembra, dado que se trabajó de forma simultánea con el serotipo 1 y 3 no resulta posible descartar una contaminación con dichos serotipos en los medios de cultivo.

Por otro lado, es posible establecer que el antígeno preparado que estaba destinado a detectar serotipo 1, logro detectar serotipo 3, dado que entre estos dos serotipos es más probable encontrar la llamada reacción cruzada. Esto se debe a las semejanzas que poseen estructuralmente ambos serotipos, los cuales son los indicadores que se emplean para la serotipificación en este caso aglutinación (LPS o capsula), llevándonos de cierta forma de nuevo a la primera teoría de falla en el procedimiento o contaminación; desde el inicio del procedimiento, la cepa que estaba etiquetada como serotipo 1 ya se encontraba mezclada o contaminada con el serotipo 3 o viceversa. Cabe mencionar que el interés mostrado por serotipos 1 y 3 es mayor por la varianza de resultados que se obtuvieron. Dicha variación no se observó en serotipos 5 y 7. También puede atribuirse la diferencia en resultados al momento de lectura, puesto que es validado únicamente por el ojo del investigador y pueden verse variablemente afectados los resultados.

Pretendiendo hallar la causa más exacta y obtener un antígeno que sea calificado como confiable y seguro, se repitió el ensayo solo para dos serotipos: 1 y 3. El antígeno resultante de este segundo ensayo fue llamado Antígeno B2 y se trabajó esta vez cada serotipo por separado empleando otras cepas (de igual forma proporcionadas por el laboratorio). El procedimiento para la obtención de la biomasa fue exactamente el mismo, hasta diferir en el número de lavados, los cuales se redujeron a una cantidad similar al número de lavados que se aplicaron en los serotipos 5 y 7, en este caso el resultado fue de 12 lavados en ambos serotipos. Cabe mencionar que el número de lavados estaba sujeto a una prueba meramente visual, es decir, el procediendo establece que se repite dicho paso hasta que el sobrenadante sea transparente, no obstante, es un criterio que solo el investigador establece. Al repetir las pruebas de aglutinación, los resultados, esta vez, siendo comparados con los obtenidos en el primer ensayo y con el antígeno ya estandarizado fue notable la concordancia entre Antígeno A y Antígeno B2.

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*.*

---

Los distintos resultados para ambos ensayos pueden explicarse con los ajustes que se realizaron en el procedimiento; primero al trabajar con cepas diferentes y de forma separada se redujo de forma significativa el riesgo de una contaminación. Segundo; la cantidad de lavados aplicados en el segundo ensayo al ser menor disminuyó la posibilidad de perder biomasa en el proceso dado que se registró una mayor cantidad de biomasa, podemos añadir que entre mayor sean los gramos de biomasa (a pesar de que la concentración final de antígeno es la misma) y más puros, es decir libres de contaminación con otros serotipos, el antígeno se vuelve más sensible y específico al momento de realizar la prueba de aglutinación en placa.

La detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el presente trabajo se basa principalmente en la presencia de inmunoglobulinas y de ellas han sido identificadas en cerdos: IgA, IgG, IgM, IgE e IgD, de las cuales IgG e IgM son las que se encuentran en mayor concentración en distintos fluidos del cerdo como son suero, plasma, calostro y saliva.<sup>33</sup> El antígeno que se obtuvo en el presente trabajo, se basa en la detección por aglutinación en placa de IgM e IgG en suero.

La respuesta inmune puede detectarse con anticuerpos circulantes entre los 10 a 14 días después de la infección, con un máximo título entre las 4 y 6 semanas postinfección. El rol clave en la protección del sistema inmune en casos de pleuroneumonía porcina es jugado por la IgG e IgM circulantes en sangre. En las fases iniciales de la infección, estos se difunden a través de la barrera hematoalveolar del parénquima pulmonar dañado por la inflamación, actuando como anticuerpos neutralizantes para las toxinas Apx y contra otros factores de virulencia como la capsula, LPS, y proteínas de unión a la transferrina.<sup>25</sup> Lo anterior sugiere, que las muestras de sueros de cerdos en este ensayo fueron obtenidas en las primeras semanas de infección y la prueba de aglutinación en placa con el Antígeno es útil en la detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en los primeros días de la infección. No obstante, se han realizado diversos estudios en donde lechones que fueron expuestos a altas dosis de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a las 3 y 8 semanas de edad tuvieron niveles altos de anticuerpos IgM contra el LPS de App, lo anterior puede apuntar la teoría que la prueba de aglutinación con el Antígeno también es útil para el diagnóstico en las primeras semanas de lechones.

Por otra parte, los anticuerpos pueden mantenerse a bajo título durante muchos meses o inclusive pueden desaparecer cuando no hay más exposición a la bacteria,<sup>25</sup> esto puede ser la causa de que los resultados de la granja El Llano Guanajuato se reportaran como negativos o simplemente la granja se encontraba libre de la infección.

## 7.0 Conclusiones

Se preparó un Antígeno de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por serotipo (1, 3, 5 y 7) para detectar IgG e IgM, dichos anticuerpos pueden ser detectados en sueros en las primeras semanas pos infección en cerdos (IgG) y en las primeras semanas de vida en lechones (IgM). El antígeno que se obtuvo fue comparado con un antígeno ya estandarizado y, al mostrar significativas diferencias entre ambos en cuanto a la cantidad de muestras identificadas como positivas por cada uno, se repitió el ensayo en dos serotipos únicamente, esto, con cambios en la metodología como lo son el número de lavados y la producción de biomasa de cada serotipo por separado para evitar una contaminación o reacción cruzada. Dichos cambios arrojaron resultados notablemente más parecidos comparando con el antígeno estandarizado. Dado lo anterior, el antígeno final que se obtuvo en el presente trabajo resulto ser confiable por lo que está disponible para su uso en otros proyectos.

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

### 8.0 Referencias

- 1.- Acumedia,(2017) PPLO Broth W/O CV inserto, NEOGEN Corporation, obtenido en [www.neogen.com](http://www.neogen.com).
- 2.- Alton, G.G., Jones, L. M. & Pietz, D. E. (1975) *Laboratory Techniques in Brucellosis, Second edition, World Health Organization*. Geneva-
- 3.- Britania. (2017). Antígeno de Huddleson, REF B1865447, recuperado de [ww.britanialab.com](http://ww.britanialab.com)
- 4.- Dennis W. Muñoz V. (2005) *Técnicas de diagnóstico para la detección de Actinobacillus pleuropneumoniae causante de la pleuroneumonía porcina*. Avances en Ciencias Veterinarias, Vol. 20, No. 1 y No 2 .
- 5.- Escribano, A.M. Gutierrez, S. Martinez Subiela, (2012). *Validation of three commercially available immunoassays for quantification og IgA, IgG, and IgM in porcine saliva samples*. Research in Veterinary Science, Elsevier, No. 93 –
- 6.- García Parreño O. (2007). *Persistencia de la inmunidad pasiva contra Actinobacillus pleuropneumoniae en porcinos en etapa de recría*, (Tesis) Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima, Perú.
- 7.- Gottschalk, M. (2015) *Patogenicidad de Actinobacillus pleuropneumoniae*, Published in IVIS , Suis No.
- 8.- Gottschalk, M. (2014) *Diagnostico y control de Actinobacillus pleuropneumoniae*. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Montreal, recuperado de : [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar),
- 9.- Gottschalk, M. (2015). *The challenge of detecting herds sub-clinically infected with Actinobacillus pleuropneumoniae*. The veterinary Journal , Elsevier, No. 206.
- 10.- Idalia Enríquez V. D & Godínez Vargas, R. (2003) *Adhesión de Actinobacillus pleuropneumoniae a componentes de matriz extracelular de cerdo*, Ciencia veterinaria No. 9.
- 11.- Lomonte Vigliotti, B. (2007). *Manual de métodos inmunológicos*. Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Costa Rica.
- 12.- M. Gottschalk. (2012). *Nuevos avances en el diagnóstico y control de Actinobacillus pleuropneumoniae, un patógeno todavía de actualidad*. Conferencia extraída de Memorias del XI Congreso Nacional de Producción Porcina. Salta. Argentina.

## *Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.*

---

- 13.- M. V. Herrera, B. M. V. Cárdenas, C. (2003). *Brucelosis: Diagnóstico serológico y vacunas*, Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de productos Biológicos Lima, Perú
- 14.- Medrano Muñoz, A. (2003) *Expresión Recombinante en E. coli de antígenos de Actinobacillus pleuropneumoniae para Vacunación y Diagnóstico*. Universidad Autónoma de Barcelona
- 15.- Monter Flores, J. L. (2010). *Infección por Actinobacillus pleuropneumoniae en un modelo murino*. Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de sanidad, España.
- 16.- Moral, M. (2013) *Ministerio Salud de la Nación, enfermedades infecciosas brucelosis Diagnóstico de Brucelosis Guía para el equipo de salud*, Dirección de Epidemiología, República Argentina
- 17.- Mori A. L., Calle E. S., & Pinto J. C. (2010). *Frecuencia de infección con Actinobacillus pleuropneumoniae en granjas porcinas tecnificadas de la costa peruana*. Rev Inv Vet, No. 21, Perú.
- 18.- Mori Álvarez, L. (2007). *Frecuencia de infección con Actinobacillus pleuropneumoniae en granjas porcinas tecnificadas de Arequipa, Lima, Ica y La Libertad*. (Tesis para optar por título de Médico Veterinario) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú .
- 19.- Morilla González, A. (2005) *Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdo*. 2° edición, Editorial Manual Moderno.
- 20.- Plonait, H., Bickhardt, K., (2001). *Manual de las enfermedades del cerdo*. Ciencia veterinaria series, Editorial Acribia.
- 21.- Rajme-Manzur, D., Hernández-Reyes, M., Cruz-Soca, M. Padron-Fajardo, L. (2017). *Evaluación de un antígeno de Brucella abortus para aglutinación en placa como prueba tamiz en el diagnóstico de la brucelosis bovina*- VaccinMonitor, No. 26.
- 22.- Rivers, R., Andrews, E., González-Smith, A., Donoso, G. & Oñate A. (2008) *Brucella abortus: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos*. Laboratorio de Inmunología Molecular, Arch. Med. Vet. 38, N° 1 Departamento de Microbiología, Chile.
- 23.- Rodríguez Ferri, E. & Gutiérrez, C. (2002). *Pleuroneumonía Porcina*, *Información Veterinaria* 234; 35-44, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Cantabria, España. Recuperado de [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

***Preparación y evaluación de un antígeno para detectar Actinobacillus pleuropneumoniae.***

---

- 24.- Rodríguez Méndez, G. A. (2010). *Detección e identificación simultánea y discriminación de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipos 1, 5 y 7 por técnicas de PCR múltiple basadas en genes apxIVA Y cps.*, Universidad Javeriana, Bogotá.
- 25.- Romero Hurtado, S. & Iregui, C. A. (2010). *El Lipopolisacárido*. Revista de Medicina Veterinaria No. 19,
- 26.- Ruiz, A., Muñoz, D. & Quezada, M. (2011). *Estudios de pleuroneumonía contagiosa porcina en Chile*. Revista Porcicultura Iberoamericana 1:4 . Chile.
- 27.- Salazar- F.,Ramírez-Porras, R. & Mosqueda-Ara, Z. (2001) *Sensibilidad in vitro de cepas de Actinobacillus pleuropneumoniae y Pasteurella multocida tipo "A" ante diferentes antimicrobianos*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, Rev. Biomed Vol. 12, No. 3. Recuperado de <http://www.uady.mx/~biomedic/rb011234.pdf>,
- 28.- Straw, B. S., D'Allaire, S., Mengeling, W.L. & Taylor, D. J. (2001). *Enfermedades del cerdo*. 8° edición, Editorial Intermedica.
- 29.- Vega López, C.A., Ariza Andraca, R., Rodríguez Weber. F. L. (2008) . *Brucelosis. Una infección vigente*. Acta médica grupo ángeles. Volumen 6, No. 4. Recuperado de [www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2008/am084c.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2008/am084c.pdf)
- 30.- Zielinski,G. (2006) *Infecciones por Actinobacillus Pleuropneumoniae: situación en Argentina*. Área Producción Animal, E.E.A. INTA Marcos Juárez, Argentina recuperado de: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar),
- 31.- Zimmermann, X. (2001) *Manual de las Enfermedades del Cerdo*, Editioal Acribia
- 32.- Williams, J de J., Torres-León, M., Echeverria-Coello, P. & Matos-Medina, M. C. (2000). *Aislamiento e identificación de Actinobacillus pleuropneumoniae en pulmones de cerdos con pleuroneumonía crónica sacrificados en el rastro municipal de Mérida*, Rev. Biomed, Vol.11, No. 3 . Yucatán, México.