



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**“Preparación de un antígeno de *Haemophilus parasuis* para el diagnóstico de la Enfermedad de Glässer en cerdos”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ROGELIO HERNÁNDEZ MORALES**

**ASESORA: DR. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
COASESOR: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO**

**CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR 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

**Preparación de un antígeno de Haemophilus para el diagnóstico de la Enfermedad de Glässer en cerdos.**

Que presenta el pasante: **Rogelio Hernández Morales**

Con número de cuenta: **087051092** para obtener el Título de la carrera: **Química Farmacéutico Biológica.**

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 28 de Junio de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
<b>VOCAL</b>	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M.F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Alberto Natahliel Soto Guevara	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

## *Dedicatoria*

*Dedico este trabajo de tesis a mi Madre, Hermanos, Esposa e Hijos. Los cuales son la razón y el motivo de mi vida.*

*A mi Padre y a Mary, que siempre me impulsaron a continuar con esta empresa.*

*A la “UNAM” mi segundo hogar, “POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”*

## *Agradecimientos*

*Quiero agradecer a Dios, que me ha dejado llegar hasta este punto de mi vida, que me cuidó en todas las aventuras que recorrí por el camino a través del tiempo.*

*A mi Madre, la que siempre me impulso para realizar esta encomienda en mi vida y me apoyo para poder terminar de cerrar este círculo.*

*A mi Padre que inculco en mí el deseo de terminar una carrera.*

*A mis hermanos Eduardo, Alejandra y Oscar, que siempre han formado parte de mi camino, a mi lado hombro con hombro.*

*A mi Esposa que me ha dado ánimo para continuar y terminar este proceso.*

*A mis hijos que son el motor de toda mi vida, gracias por aparecer en mi vida y darle un sentido a mi vida.*

*A la Doctora Susana, que me abrió las puertas del laboratorio, la que me soporto durante la huelga, y sin embargo me ayudo e impulso en un trance en el que solo yo podría salir, pero nunca sin el apoyo de tanta gente linda que me he encontrado en mi camino a dios gracias ella estaba ahí.*

*A todas las personas que me ayudaron a mantener el camino y con tumbos y desviaciones a llegar a la meta. Arturo, Rafael, Julio, Estela, Omar, Toño, Humberto, Hugo, Ricardo, Maya, Lucha, Jesica, Hilda, Yolanda, Sawaya, Killer, Teto, Perica, Caifan, Israel Castro, Gerardo, Bety, Israel, Anizayadeth, y tantas más que no puedo enumerarlas a todas, pero ahí estuvieron en el camino.*

## INDICE

	Pág.
<b>INDICE</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1 Enfermedad de Glässer.....	3
1.2 Generalidades.....	4
1.2.1 Enfermedades en animales.....	5
1.2.2 Medios de cultivo y Pruebas Bioquímicas Importantes.....	5
1.3 Etiología.....	5
1.4 Epidemiología.....	6
1.5 Patogenicidad.....	8
1.6 Signos Clínicos y Lesiones.....	8
1.7 Diagnóstico de Laboratorio.....	9
1.8 Tratamiento.....	18
1.9 Prevención e Inmunidad.....	18
1.10 Normas de manejo.....	20
1.11 Erradicación.....	20
1.12 Hipótesis.....	20
<b>2.- OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 Objetivo General.....	21
2.2 Objetivos Particulares.....	21
2.2.1 Obtención de la Biomasa.....	21
2.2.2 Acondicionamiento del Antígeno.....	21
2.2.3 Evaluación del Antígeno.....	21
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
3.1 Cepas.....	22
3.2 Obtención de los sueros de cerdo para las pruebas serológicas.....	22
3.3 Controles positivos (+) y negativos (-).....	22
3.4 Aislamiento.....	22
3.5 Identificación.....	23
3.6 Obtención de la Biomasa de <i>Haemophilus parasuis</i> .....	23
3.7 Metodología para la Preparación del antígeno de <i>Haemophilus parasuis</i> .....	24
3.8 Evaluación de las muestras serológicas.....	26
3.9 Obtención y diagnóstico en muestras de suero.....	26
3.10 Procedimiento del método serológico: Aglutinación en placa.....	26
3.10.1 Interpretación del método serológico.....	26
3.10.2 Principios del procedimiento.....	26
<b>4.- RESULTADOS</b> .....	27
<b>5.- ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	28
<b>6.- DISCUSIÓN</b> .....	29
<b>7.- CONCLUSIONES</b> .....	30
<b>8.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	31
<b>9.- ABREVIATURAS</b> .....	38
<b>10.- GLOSARIO</b> .....	39
<b>11.- ANEXO</b> .....	44

## RESUMEN

En el presente trabajo se obtuvo un antígeno de superficie a partir de *Haemophilus parasuis* para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Glässer en cerdos. Se trabajó con una cepa de *Haemophilus parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), proporcionada por el cepario del CINVESTAV.

Inicialmente se sembró la bacteria en medio de agar PPLO enriquecido con Factor V (NAD), posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para su identificación, una vez identificado se sembró en caldo PPLO enriquecido con Factor V, para obtener la biomasa requerida, la biomasa se trató de manera que se pudiera obtener el antígeno de la bacteria lo más puro posible. Después de haber obtenido el antígeno este se coloreó con Rojo de Fenol (RF) para utilizarlo con sueros de cerdos, este antígeno teñido sirvió para la realización de pruebas de aglutinación en placa, donde la reacción positiva nos mostró la formación de grumos característicos aglutinados. Se hizo un muestreo en 714 sueros de los cuales 664 fueron de campo muestreados en Chiapas y 50 en el centro de investigación de Palo Alto, Cuajimalpa. D.F. Del total de sueros 428 fueron Positivos. y 286 Negativos. Evaluando estos resultados se obtuvo 59.94% positivos y 40.06% negativos. Se utilizaron como referencia sueros de cerdos SPF (libres de patógenos específicos) vacunados con bacterina de *Haemophilus parasuis* Control (+); como Control (-), se utilizaron sueros de cerdos SPF, antes de ser vacunados con la bacterina y se hicieron titulaciones de anticuerpos (Suero inicial, Anticuerpos de *Haemophilus parasuis* Nulos) que resultaron negativos. Los resultados muestran que el antígeno resulta ser una herramienta muy importante para el diagnóstico oportuno de la enfermedad de Glässer directamente en las granjas ya que no es necesario equipo sofisticado, ni personal altamente calificado para realizar las pruebas con los sueros, y ello podría llevar a tratar oportunamente a los cerdos para obtener un mayor rendimiento en la producción porcícola.

# 1.- INTRODUCCIÓN

La enfermedad descrita por Glässer en 1910, cuyo agente etiológico es *Haemophilus parasuis*, ha sido diagnosticada prácticamente en todo el mundo y representa en la actualidad uno de los principales problemas emergentes del ganado porcino.

La enfermedad de Glässer alguna vez estuvo considerada una enfermedad esporádica de cerdos jóvenes comprometidos por estrés, polyserositis porcina y la artritis (enfermedad de Glasser), causada por el *Haemophilus parasuis*, ha emergido como una de las enfermedades bacterianas significativas que afectaban los cerdos a través del mundo.

La adopción de las nuevas tecnologías de la producción para las granjas de alto-grado-salud y la aparición de nuevos síndromes respiratorios han contribuido a un incremento en la prevalencia y la severidad de la enfermedad. El manejo de la enfermedad con los antibióticos, la vacunación, y otras estrategias no es siempre acertada en contradicción con las pérdidas de producción debido a la infección por el *Haemophilus parasuis*.

Su prevalencia se ha incrementado durante los últimos años de forma espectacular asociada a PRRS; se considera, en la actualidad, uno de los problemas emergentes porcinos de mayor interés económico y científico, asociado a determinadas prácticas de manejo denominadas explotaciones "excelentes" desde el punto de vista sanitario e incluyendo explotaciones SPF (libres de patógenos específicos) o, simplemente, de alto estatus sanitario.

Se conoce que el estatus inmune de una manada es un determinante del resultado de la patogenicidad de la infección. Sin embargo, la heterogeneidad entre cepas del *Haemophilus parasuis* es notable, y una comprensión mejor de la asociación de estos diferentes fenotipos y genotipos con la potencia de la virulencia y la inmunidad protectora está comenzando a emerger. (Nielsen y Danielsen 1975).

En el caso de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP), esta no afecta por si sola una explotación porcina, el solo diagnóstico serológico/ microbiológico de ella sola no es suficiente, por lo que se debe de realizar la detección de las otras enfermedades como Fiebre Porcina Clásica; Enfermedad de Aujeszky; PRRSv; Neumonía Enzoótica y Enfermedad de Glasser contribuyen y complican el control y/o erradicación de la PCP, lo mismo está sucediendo con otros agentes infecciosos, ya sean primarios o secundarios (Ciprián, 1999).

## 1.1.- ENFERMEDAD DE GLÄSSER

Esta enfermedad fue primeramente descrita por Glässer en 1910, como una inflamación fibrinosa de las articulaciones de los cerdos jóvenes, asociada a condiciones estresantes de manejo o traslados, con alta mortalidad. Esta producida por el *Haemophilus parasuis*, microorganismo que afecta exclusivamente al ganado porcino. La enfermedad está presente en los cinco continentes. Su control se puede realizar mediante la utilización de vacunas y antibióticos, con un correcto programa de manejo.

La enfermedad de Glässer's afecta solamente al cerdo, de cuyas fosas nasales se recupera el agente productor (*Haemophilus parasuis*), en ocasiones, sin relación con cuadro clínico alguno, hasta el punto de que representa una de las especies bacterianas más prevalentes en los lechones de una semana de edad, a los que, además, colonizan precozmente. En el caso del pulmón, el agente etiológico se comporta como un oportunista, que produce enfermedad asociado con otros agentes bacterianos o víricos o coincidiendo con una inmunodepresión. (Rodríguez Ferri, EF., Barceló, J, 2002).

## 1.2.- GENERALIDADES

**Género:** *Haemophilus*

### Características generales:

*Haemophilus parasuis* se presenta como pequeños bacilos o cocobacilos acusadamente pleomórficos, con ocasional presencia de formas filamentosas. Su longitud, por ello, resulta extremadamente variable, desde 1 a 7 µm de largo por 0.2 a 2 µm de ancho.

Son microorganismos Gram negativos, con cápsula o sin ella (según los serotipos y, aún, según las cepas) en cultivos de laboratorio, y dependientes para su crecimiento del factor V de la cascada de coagulación de la sangre (nicotinamida adenina dinucleótido, NAD).

Bioquímicamente *Haemophilus parasuis* se caracteriza por una actividad metabólica discreta, en la que destacan la presencia de las enzimas catalasa y oxidada, careciendo, sin embargo, de ureasa. Reducen los nitratos a nitritos, pero ni producen indol del triptófano, ni descarboxilan la ornitina, la lisina o la arginina.

Producen ácido de diversos sustratos como la glucosa, manosa, maltosa y sacarosa, pero son negativas en el caso de la xilosa, lactosa, manitol, rafinosa y arabinosa. En el caso del inositol se obtienen resultados variables según la cepa de estudio, igual que ocurre con la producción de SH<sup>2</sup>. (Nicolet y Morozumi 1986a)

### Especies importantes:

*Haemophilus influenzae*

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (*Haemophilus pleuropneumoniae*).

***Haemophilus parasuis*.**

*Haemophilus paragallinarum*.

*Haemophilus somnus* y *Taylorella* o *Haemophilus equigenitalis* son especies de clasificación incierta en el género.

### Hábitat

Son comensales del aparato respiratorio superior de los animales.  
Membranas mucosas de animales y hombre.

### Factores de virulencia

#### Cápsula

Como es sabido la cápsula es la parte más externa de la bacteria, en el caso de *Haemophilus parasuis* no es la excepción, se ha encontrado que algunos de los serotipos actuales son capsulados y que presumiblemente juegan un papel importante en la patogenia de la enfermedad, aunque se presume que dependiendo del medio con el que se realiza el primo aislamiento, el número de pases in Vitro, así como de donde fue obtenida la muestra presenta o no cápsula.

La composición química de los polisacáridos que conforman la cápsula, y que aparentemente son un factor crítico en la virulencia y patogenia de la enfermedad, son similares en las demás bacterias de su género, son ácidas, de alto peso molecular, con polisacáridos heterogéneos, en donde se presentan unidades repetitivas de dos o tres azúcares como el glicerol, acetil fosfato, ácido carboxílico o urínico. (Mendoza, S., Ciprian, C.A. 2001).

#### Lipopolisacáridos

El género *haemophilus* se pierden las cadenas laterales del antígeno "O", se pretende que esto le ayuda a evadir el las repuestas antígeno específicas del huésped. Y las actividades lipooliosacáridos son genéricamente las siguientes; melifican amebocitos del género *Limulus* y son pirogénicos. (Mendoza, S., Ciprian, C.A. 2001).



## **Proteínas externas de membrana.**

Se sabe que una proteína de 42Kd cruza serológicamente con la proteína de 40 Kd de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Haemophilus parasuis* son no modificable a una temperatura de 37° y la de *Pasteurella multocida* sí. (Mendoza, S., Ciprian, C.A. 2001).

Por homología de amino terminales se cree que están relacionadas a purinas, las cuales desempeñan la función de canales de paso para moléculas hidrofílicas pequeñas y que probablemente se encuentran involucradas en el proceso infeccioso como la *Pasteurella multocida*, en donde se sabe que los anticuerpos dirigidos en contra de esta son protectivos. (Mendoza, S., Ciprian, C.A. 2001).

## **Pared celular**

El *Haemophilus parasuis* se sabe que existen dos patrones electroforéticos diferentes (PAGE tipo I y II), donde se sabe que la mayoría de los aislamientos de procesos infecciosos realizados en Dinamarca son cepas no capsuladas y que corresponden al PAGE tipo II. (Mendoza, S., Ciprian, C.A. 2001).

## **Antígenos termoestables.**

Gracias a el uso de los antígenos termoestables se realizó la actual clasificación de los 15 serotipos diferentes de *Haemophilus parasuis* utilizando una prueba de precipitación en agar-gel (AGPT). Los serotipos 1,5,10,12,13 y 14 en S.P.F. causan muerte o están moribundos a los 4 días posdesafío, los serotipos 2, 4 y 15 producen poliserositis pero no la muerte, el serotipo 8 solo produce signos y lesiones leves, mientras que los serotipos 3, 6, 7, 9 y 11 no producen signos clínicos ni lesiones. (Mendoza, S., Ciprian, C.A. 2001).

### **1.2.1.- Enfermedades de animales.**

*Haemophilus paragallinarum*: Coriza contagiosa de las aves

*Haemophilus somnus*: Afecta a los bovinos de tres formas principalmente:

*Haemophilus equigenitalis*: Endometritis y cervicitis en equinos; transmisión venérea.

*Actinobacillus pleuropneumoniae*: (*Haemophilus pleuroneumoniae*) Neumonía con alta mortalidad en ausencia de factores predisponentes en cerdos.

*Haemophilus parasuis*: enfermedad de Glasser de cerdos (poliserositis).

### **1.2.2.- Medios de cultivo y pruebas bioquímicas importantes**

Para su cultivo se requieren factores de crecimiento: el factor X (protoporfirina IX o protohemina) y/o protoporfirina y el factor V (nicotinamida adenina dinucleótido o NAD).

Los requerimientos del factor X y V pueden determinarse inoculando agar triptosa conteniendo una estría de *Staphylococcus aureus* como cepa nodriza (satelitismo). Algunas especies requieren 5-10% de CO<sub>2</sub>.

## **1.3.- ETIOLOGÍA**

Glässer (1910) el primer reporte señaló la asociación de un bastón gram-negativo pequeño con serositis fibrosa y poliartritis en cerdos. Inicialmente, el agente causal fue identificado como *Hemophilus suis* por Hjërre y Wramby (1943) y *Haemophilus influenza suis* por Lecce (1960). El nombre fue cambiado a *Haemophilus paraseis* basados en la demostración que el organismo no requirió el factor X (hemina u otras porfirinas) para el crecimiento (Biberstein y White 1969; Kilian 1976). La posición taxonómica del *Haemophilus parasuis* dentro la *Pasteurellaceae* sigue siendo incierta, debido a una carencia de la homología de los ácidos nucleicos con otras especies de *Haemophilus* (De Ley *et al.* 1990; Dewhirst *et al.* 1992).

Considerando la heterogeneidad genotípica también se ha demostrado entre las cepas de *Haemophilus parasuis* (Smart *et al.* 1998; Rapp-Gabrielson *et al.* 1992a; Blackall *et al.* 1997).

Esto tiene propuesto que más de una especie bacteriana se puede representar por la cepa identificada como *Haemophilus parasuis* (Morozumi *et al.* 1986; Dewhirst *et al.* 1992).

Al microscópico, el *Haemophilus parasuis* es pleomórfico, variando de cocoobacilos largos y delgados en cadenas filamentosas a cortos y anchos. La cápsula puede generalmente estar presente, pero la expresión es influenciada por el cultivo *in vitro* (Rapp-Gabrielson *et al.* 1992b). Así, la significación del informe que asocia la carencia de cápsula con la virulencia es necesaria para futuras investigaciones (Kobisch y Desmettre 1980; Morozumi y Nicolet 1986a; Kielstein 1991).

El Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD o factor V) se requiere para el crecimiento y se puede proveer por la sangre calentada (agar chocolate) o por el crecimiento satelital alrededor de una estría de la cepa de *Staphylococcus*.

Después de 24-48 horas de crecimiento, las colonias son pequeñas, translúcidas, y no hemolíticas en agar sangre. El primer reporte de la existencia de serotipos de (Bakos *et al.* 1952). En años subsecuentes, la expansión de este esquema de serotipificación condujo a otros investigadores a varias propuestas para los nuevos serotipos (Schimmel *et al.* 1985; Morozumi y Nicolet 1986b; Nicolet *et al.* 1986; Kielstein 1991; Rapp-Gabrielson y Gabrielson 1992). Actualmente, se reconocen 15 serotipos basados en la inmunodifusión (Kielstein y Rapp-Gabrielson 1992).

El antígeno tipo-específico es un polisacárido termoestable (Morozumi y Nicolet 1986b). Presumiblemente esta era la cápsula de lipopolisacárido (LPS). Un alto porcentaje de aislamientos es no tipificable, indicando que algunos aislamientos pueden no expresar el antígeno tipo-específico de suficiente o la existencia probable de serotipos adicionales.

## 1.4.- EPIDEMIOLOGÍA

El *Haemophilus parasuis* infecta solamente los cerdos. Se aísla comúnmente de secreciones nasales de cerdos sanos (Bertschinger y Nicod 1970; Haris *et al.* 1969; Smart *et al.* 1989) y de los pulmones de cerdos con neumonía, pero no generalmente de los pulmones normales (Little 1970; Moller *et al.* 1993).

En granjas convencionales, el organismo es uno de los primeros y más tempranas bacterias aisladas de las esponjas nasales de cerdos de 1 semana de edad (Kott 1983.) Históricamente, la enfermedad de Glasser se ha considerado una enfermedad esporádica de los cerdos jóvenes comprometidos por el estrés. Sin embargo, el cuadro etiológico en cerdos libres de patógenos específicos (SPF) o las manadas de estatus-de alta-salud que representan a una población inmunológicamente ingenua es mucho muy diferente (Nielsen y Danielsen 1975; Baehler *et al.* 1974; Menard y Moore 1990).

La Introducción del *Haemophilus parasuis* puede resultar en enfermedades sistémicas de alta morbilidad y mortalidad, afectando los cerdos en cualquier etapa de la producción. Actualmente, el *H. parasuis* es uno de los problemas más serios asociados con la mezcla de cerdos de diferentes granjas por la introducción de animales reproductores nuevos en una granja (Smart *et al.* 1989, Menard y Moore 1990).

El papel del *Haemophilus parasuis* en enfermedades respiratorias de los cerdos es el más problemático. La demostración de la asociación y colonización de *Haemophilus parasuis* con rinitis purulenta pudiera ser un posible factor de predisposición para otros patógenos virales y bacterianos (Gois *et al.* 1983; Vahle *et al.* 1995, 1997). El *Haemophilus parasuis* en la neumonía, se ha asumido como un invasor oportunista secundario, causando enfermedad solamente en asociación con otros agentes virales y bacterianos. Tal relación era evidente después de la infección de los cerdos inoculados experimental con el virus de pseudorabia y con el serotipo 4 de *Haemophilus parasuis* (Narita *et al.* 1994).

Sin embargo, varios informes recientes indican que el *Haemophilus parasuis* puede ser un agente primario en bronconeumonía fibrinosupurativa (Pohle *et al.* 1992; Barigazzi *et al.* 1994; Solano *et al.* 1998).

El aislamiento del *Haemophilus parasuis* en neumonía se ha incrementado substancialmente en años recientes y se cree asociado al creciente predominio de pulmonía por *Mycoplasma* así como patógenos virales respiratorios tales como el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), virus de la influenza en los cerdos, y Coronavirus respiratorio porcino.

El *Haemophilus parasuis*, en conjunto con el *Mycoplasma hyorhinis*, fueron aislados del 51,2% de pulmones de los cerdos infectados con PRRS (Kobayashi *et al.* 1996). Sin embargo, las impresiones clínicas de PRRS son exacerbadas por la infección de *H. parasuis* esto no se ha verificado en modelos experimentales (Cooper *et al.* 1995; Solano *et al.* 1997).

El potencial patógeno de las cepa(s) del *Haemophilus parasuis* que actúa en las granjas es también un factor de progresión y severidad de la enfermedad sistémica. Los serotipos aislado comúnmente de regiones del tracto respiratorio superior en cerdos incluyen serotipos aislados no frecuentemente de los sitios sistémicos (Bloch 1985; Rapp-Gabrielson 1993). Puede haber una subpoblación de cepas del *Haemophilus parasuis* que se encuentre en el tracto respiratorio que es capaz de la invasión sistémica y causar enfermedad (Rapp *et al.* 1986; Rapp-Gabrielson 1993).

Una asociación entre el aislamiento de serotipos y la poliserositis era mencionada en varios estudios (Bakos *et al.* 1952; Morozumi y Nicolet 1986b; Kielstein 1991). Recientemente, las diferencias en virulencia entre serotipos eran demostrada inoculando cerdos libres de patogenos específicos (SPF) o de animales nacidos por cesarea y privados del calostro (CDCD) con las cepas de los 15 serotipos (Kielstein y Rapp-Gabrielson 1992; Nielsen 1993; Amano *et al.* 1994; Rapp-Gabrielson *et al.* 1995). En estos estudios, las cepas que representaban algunos serotipos era altamente virulenta y las cepas que representaban otros serotipos eran avirulentas.

La virulencia de las serotipos de campo aisladas eran constantes en comparación con la cepa de referencia, indicando una relación causal entre serotipos y virulencia (Tabla 1). Sin embargo, la demostración de que dos serotipos de las 14 cepas se diferenciaron por la virulencia para los cerdos CDCD indica que otros factores externos en los serotipos contribuyen a la potencia de la virulencia de una cepa (Rapp-Gabrielson *et al.* 1995).

El gel de electroforesis de dodecyl sulfato de sodio-polyacrylamida (SDS-PAGE) En la bacteria completa y en la membrana externa, las proteínas también demuestran heterogeneidad fenotípica entre las cepas (Morozumi y Nicolet 1986a; Rapp *et al.* 1986; Morikoshi *et al.* 1990; Rosner *et al.* 1991; Rapp-Gabrielson *et al.* 1992a). Estos informes indican una posible asociación del potencial de virulencia con la estructura específica de la proteína; pero la relación exacta entre la estructura de la proteína, serotipo, y del potencial de virulencia permanece indefinido. La heterogeneidad de los LPS del *Haemophilus parasuis* han sido demostrados por los modelos de SDS-PAGE e “immunoblotting” con los anticuerpos monoclonales, pero los modelos de LPS no han sido asociado a la virulencia (Zucker *et al.* 1994; Zucker *et al.* 1996).

Las estructuras filamentosas presumiblemente son fimbrias, y se ha demostrado su presencia en algunas cepas de *Haemophilus parasuis*, pero sigue habiendo un papel en la adherencia y la patogenicidad que falta por ser definido (Münch *et al.* 1992).

**TABLA 1.** Virulencia de cepas representativas de serotipos de *Haemophilus parasuis* por cerdos SPF.

Serotipos de <i>H. parasuis</i>	N° de Cepas Evaluadas	Virulencia <sup>a</sup>
1, 5, 10, 12, 13, 14	10	Muerte a las 96 horas
2, 4, 15	10	Severa poliserositis y artritis en la necroscopia
8	1	Signos clínicos leves y lesiones grandes
3, 6, 7, 9, 11	8	No signos clínicos o lesiones grandes

Fuente: Kielstein y Rapp-Gabrielson 1992.

<sup>a</sup>Cerdo inoculado intraperitonealmente con 5 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias.

## 1.5.- PATOGENICIDAD

Los modelos experimentales del desafío se han desarrollado para investigar la patogenicidad de la infección con *Haemophilus parasuis*. (Vahle *et al.* 1995) examinaron acontecimientos secuenciales en la infección por inoculación de cerdos CDCD intranasal con una cepa virulenta de *Haemophilus parasuis*. En el plazo de 12 horas postinoculación, el *Haemophilus parasuis* fue aislado de la cavidad nasal y tráquea; después de 36 horas, de cultivo de sangre; y en 36-108 horas, de tejido sistémico.

La colonización temprana de la cavidad nasal media y caudal y de la tráquea también fue demostrada por microscopía de transmisión electrónica e inmunohistoquímica. (Vahle *et al.* 1997). La colonización fue asociada a rinitis purulenta, pérdida focal de cilios, y a la hinchazón aguda de las células dentro de la mucosa nasal y traqueal.

La infección *in vitro* de los cornetes nasales expresa una marcada reducción en actividad ciliar y daño a células epiteliales ciliadas (Vahle 1996). El *Haemophilus parasuis* no fue asociado de cerca a los cilios o al epitelio, y el mecanismo de la colonización o de la destrucción celular no fue definido. La observación de estos investigadores que el *Haemophilus parasuis* coloniza preferentemente la cavidad nasal y la tráquea, y no las tonsilas, esta en concordancia con la capacidad de aislamiento de especímenes de *Haemophilus parasuis* de la cavidad nasal, pero no de las tonsilas o del pulmón, de cerdos del rastro (Moller *et al.* 1993).

En contraste, ha estado señalado que el antígeno del *Haemophilus parasuis* fue detectado en tejido fino tonsilar pero no en la cavidad nasal por la tinción de inmunoperoxidasa y el examen en microscopía electrónica (Amano *et al.* 1994). La lesión mucosal puede realzar la invasión. Los factores microbianos y del huésped principalmente implicados con la infección sistémica no se saben; sin embargo, la virulencia de algunas cepas es notable.

La inoculación intratraqueal de menos de 100 unidades formadoras de colonias de las cepas de *Haemophilus parasuis* que representaban varios serotipos causó enfermedad sistémica y muerte en cerdos de CDCD después de algunos días (Rapp-Gabrielson *et al.* 1995). La Bacteremia es evidente en cerdos en el primer momento de la infección (Vahle *et al.* 1995). Las lesiones de septicemia consisten en petequias o equimosis en el hígado, el riñón, y los meninges; el alto nivel de la endotoxina se detecta en el asma, y los trombos fibrinosos que están presentes en muchos órganos (Amano *et al.* 1994) Las múltiples réplicas subsecuentes en las superficies serosa producen la típica poliserositis fibrinosupurativa, poliartritis, y la meningitis observada en casos de campo (Amano *et al.* 1994; Vahle *et al.* 1995).

La neumonía no era prominente en un modelo de desafío, aunque el *Haemophilus parasuis* fue aislado del pulmón (Vahle *et al.* 1997). La pulmonía no era evidente después de la inoculación con la cepa de referencia de los serotipos 1, 4, o 5 (Amano *et al.* 1994), Las diferentes observaciones con respecto a la capacidad del *Haemophilus parasuis* de producir neumonía pueden ser debido a las diferencias por sí mismo en los modelos de desafío, las dosis administradas, o el potencial patógeno de las cepas examinadas.

## 1.6.- SIGNOS CLINICOS Y LESIONES

Los signos clínicos son dependientes de la localización de lesiones inflamatorias. En granjas o en cerdos sin contacto, el inicio es rápido, presentandose algunos días después de la exposición. Los signos clínicos incluyen fiebre y apatía, seguidos por inapetencia y anorexia. La disnea, dolor (es evidenciado cuando los animales chillan), hinchazón de las articulaciones, cojera, temblor, incoordinación, cianosis, postración y puede seguir la muerte.

El aborto en cerdas jóvenes y cojera crónica en berracos puede ser secuela de una infección aguda. Incluso si la infección en cerdas jóvenes es controlada por el tratamiento antibiótico, los cerdos en subsecuentes partos pueden experimentar una severa enfermedad (Menard y Moore 1990).

En cerdos convencionales, las infecciones crónicas en el corral de lechones pueden dar lugar al sacrificio de los cerdos enfermos. La tos, la disnea, la pérdida de peso, la cojera, y la capa áspera del pelo son los primeros signos clínicos.

Las lesiones macroscópicas primarias son serofibrinosas o fibrinopurulentas el exudado de uno o múltiples superficies serosas, incluyendo el peritoneo, el pericardio, y el pleural; superficie articular, particularmente las articulación carpal y tarsal, y los meninges pueden también estar implicados (Hjärre 1958; Amano *et al.* 1994).

Al Microscópico, en los exudados se observa fibrina, neutrófilos, y bajo número de macrófagos (Vahle *et al.* 1995). Menos comúnmente, las infecciones con *Haemophilus parasuis* pueden dar lugar a la enfermedad septicémica aguda en la cual la cianosis, el edema subcutáneo y pulmonar, y la muerte pueden ocurrir con la típica inflamación serosa (Riley *et al.* 1997; Peet *et al.* 1983; Desrosiers *et al.* 1986). Fascitis y miositis (Hoefling 1991) y rinitis purulenta (Gois *et al.* 1983; Vahle *et al.* 1995) también han sido reportados.

## 1.7.- DIAGNOSTICO

El diagnostico se basa generalmente en la historia de la granja, signos clínicos, y necropsias. El aislamiento bacteriano, es necesario para la confirmación, aunque no es siempre acertado. Esto es debido en parte a lo fastidiosos del crecimiento del *Haemophilus parasuis* o que también pueden estar presente otras bacterias en el espécimen.

El análisis retrospectivo de sumisión a los laboratorios de diagnóstico en Ontario indica que la incidencia verdadera de la enfermedad puede ser diez veces más alta que el reportado, debido en parte a la inhabilidad de confirmar la presencia del *Haemophilus parasuis* de especímenes sometidos (Miniats *et al.* 1986). Las autopsias se deben realizar no solamente en cerdos con signos clínicos y lesiones severas pero también en cerdos en la fase aguda de la enfermedad, antes de la administración de antibióticos.

La mejor ocasión para el aislamiento es cultivando varias superficies serosas o exudados, el líquido cerebroespinal, y la sangre del corazón, incluso si las lesiones son suaves o no evidentes. El *Haemophilus parasuis* se puede recuperar de estos líquidos cuando están inoculados en un medio de transporte antes del envío al laboratorio de diagnóstico (Mendez-Trigo y Trigo 1996).

Aunque algo laborioso para el diagnóstico rutinario, las técnicas especiales de dilución siguieron sembrando en los medios selectivos que contenían los antibióticos se han utilizado con éxito para cultivar *Haemophilus parasuis* en alto número de especímenes respiratorios (Moller y Kilian 1990; Moller *et al.* 1993). La incubación del *Haemophilus parasuis* en CO<sub>2</sub> 5% o en un tarro con una vela no hay crecimiento. Sin embargo, el uso de la sangre de caballo defibrinada y base agar triptosa sangre, más bien que de la sangre de los bovinos o de las ovejas y agar soya tripticasa, parece realzar el crecimiento.

Las pruebas bioquímicas se requieren para distinguir *Haemophilus parasuis* de otros organismos dependientes de NAD o Factor-V que pertenecen a la familia *Pasteurellaceae* que han sido aislados de los cerdos (Tabla 2) Moller *et al.* (1996) e identificados mal de vez en cuando como *Haemophilus parasuis*, estos otros Microorganismos NAD-dependientes están presentes en gran número en la cavidad nasal, las tonsilas, o los pulmones y se creen de potencial patogénico bajo (Moller y Kilian 1990; Moller *et al.* 1993).

Solo el aislamiento proporciona seguridad en el diagnóstico, a lo que se suma el hecho de que un mismo animal puede estar infectado, simultáneamente, por varios serotipos diferentes, por lo que la recuperación a partir de distintos órganos adquiere una importancia particular.

La diferenciación con otros microorganismos próximos puede llevarse a cabo mediante procedimientos de cultivo convencionales e incluso mediante la utilización de procedimientos rápidos en microceldillas complementados con la información procente de los medios con sangre (hemólisis y CAMP). A este respecto, es conveniente la diferenciación de *A. minor*, *A. indolicus*, *A. porcinus* y

*Haemophilus taxón C*; que, no siendo patógenos, comparten los mismos lugares de aislamiento primario.

Las muestras se tienen que purificar ya que es frecuente que varios serotipos estén presentes en una granja, o diferentes especies de bacterias en un solo cerdo (Smart *et al.* 1989; Rapp-Gabrielson y Gabrielson 1992; Rapp-Gabrielson 1993). Así, el aislamiento o recuperación del *Haemophilus parasuis* a partir de lesiones en sitios sistémicos grandes es la única forma de que el aislamiento obtenido está implicado en el proceso de la enfermedad.

La serotipificación, es crítica para una comprensión de la epizootiología del brote de la enfermedad y de la inmunorespuesta a la infección o a la vacunación, está disponible solamente en algunos laboratorios de diagnóstico.

En algunos lugares se practica un método de fijación del complemento para la tipificación, pero plantea el grave inconveniente de numerosas reacciones cruzadas entre serotipos, lo que unido a la posibilidad de que en la misma explotación y aún en el mismo animal circulen distintos serotipos, representa un procedimiento muy complicado de usar y extraer conclusiones prácticas útiles.

La detección directa del antígeno puede intentarse mediante métodos inmunohistoquímicos, por ejemplo un sistema avidina-biotina, como se ha demostrado en el caso del serotipo 5, en condiciones experimentales, aunque los resultados dependerán estrictamente de la calidad de los anticuerpos utilizados (policlonales o monoclonales). Tiene la ventaja de que pueden aplicarse a tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, pero no resuelve reacciones falsamente positivas con *A. pleuropneumoniae*.

La detección mediante procedimientos moleculares posee un gran futuro. A este respecto, nuestro grupo (Rodríguez Ferri *et al.*) ha puesto a punto una PCR (reacción en cadena, de la polimerasa) con primers diseñados sobre zonas de homología, conservadas, de las secuencias de los genes *tbpB* y *tbpA*, capaces no solo de detectar la presencia de *Haemophilus parasuis* entre colonias sospechosas en cultivo, sino incluso directamente de material patológico obtenido del cadáver o hisopos de secreción nasal.

El procedimiento discrimina, en función del tamaño de banda detectada, la presencia de *A. pleuropneumoniae* y *A. suis*. Otros microorganismos porcinos no patógenos del mismo género o próximos (*A. indolicus*, *A. porcinus*, *A. minor*, *Haemophilus taxón C*), de la misma familia (*P. multocida*) o de otras, resultan claramente diferenciados. El procedimiento puede completarse mediante un análisis por restricción con endonucleasas (PCR-RFLP), utilizando por ejemplo Aval, TaqI y RsaI, que permite diferenciar tipos genéticos en número importante.

El ELISA indirecto es, en la actualidad, el procedimiento más utilizado, con un antígeno obtenido a partir de un serotipo virulento, con niveles aceptables de sensibilidad y especificidad, aunque también se presentan reacciones cruzadas entre serotipos.

El diagnóstico diferencial debe incluir las infecciones bacterianas septicémicas causadas por *Streptococcus suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Actinobacillus suis*, *Salmonella choleraesuis* var. *Kunzendorf*, y *Escherichia coli*. *Mycoplasma hyorhinis* polyserositis y la artritis en cerdos de 3-a 10-semanas-de edad producen lesiones similares a *Haemophilus parasuis*.

La importancia del *Haemophilus parasuis* en bronconeumonía se puede comprobar solamente después de la identificación de otros patógenos virales y bacterianos que se puedan implicar en el proceso multifactorial de la enfermedad.

**TABLA 2.** Reacciones bioquímicas diferenciales de cerdos NAD-dependientes *Pasteurellaceae*

Otros NAD-dependientes <i>Pasterellaceae</i>						
Características Bioquímicas	<i>H. parasuis</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Actinobacillus minor</i>	<i>Haemophilus taxon C</i>	<i>Actinobacillus porcinus</i>	<i>Actinobacillus indolicus</i>
Ureasa	-	+	+	-	-	-
Hemolisis	-	+	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	+
Fermentación de						
Glucosa	+	+	+	+	+/-	+
Lactosa	-	-	+	-	+/-	+/-
Sucrosa	+	+	+	+	+/-	+
Manitol	-	+	-	-	+/-	+/-
Xilosa	-	+	+/-	-	+/-	+/-
L-Arabinosa	-	-	-	+	+/-	-
Rafinosa	-	-	+	+	+/-	+

**Fuentes:** Moller y Kilian 1990; Rapp-Gabrielson y Gabrielson 1992; y Moller et al. 1996.

**Nota:** *A. minor* era conocido antes como *Haemophilus taxon "Grupo Minor"*; *A. porcinus* era conocido antes como *Haemophilus sp. taxons D y E*; *A. indolicus* era conocido antes como *Haemophilus sp. taxon F*.

**Claves:** + Indica mayores que 90% de aislamientos son positivos; —, menos del 10% de aislamientos son positivos; +/-, reacciones variables entre aislamientos.

El cerdo ofrece ventajas comparado con el bovino de engorda, por ejemplo, el período de engorda y el peso al mercado: los cerdos son sacrificados con un peso promedio de 100 Kg entre los 4.5 y 6 meses de edad, mientras que los vacunos requieren de entre 28 y 30 meses para alcanzar los 400 Kg requeridos para el mercado. Respecto al rendimiento en canal, para el cerdo este parámetro es casi del 100% el más alto de la especie ganadera. (Ciprian y Mendoza).

La clave del éxito de la porcicultura moderna radica en aumentar los índices de ganancia diaria de peso (GDP) y disminuir la conversión alimenticia (CA). Estos parámetros se observan seriamente afectados por las enfermedades crónicas especialmente las NEUMÓNICAS. En este aspecto las neumonías juegan un papel importante debido al tipo de explotación intensiva que es sometido el ganado porcino.

Definitivamente, los grupos segregados y de un gran número de animales, situación que hoy día consideramos "granjas de alta salud", presentan un mucho menor número de patógenos, pero tienen su propia flora de patógenos adaptada a sus circunstancias (Morris et al., 2002). Ello puede suponer, pues, que ciertos agentes patógenos causen graves problemas en granjas de alta sanidad mientras que estos mismos agentes sean anecdóticos en granjas convencionales o en sistemas de producción extensiva. Un ejemplo claro de enfermedad de aparición esporádica en granjas convencionales, pero de gran importancia en granjas de alta sanidad es la enfermedad de Glässer causada por *Haemophilus parasuis*. Algunos investigadores han sugerido que el cambio de presentación epidemiológico de la enfermedad de Glässer podría explicarse por el patrón de colonización de *Haemophilus parasuis* en cerdos jóvenes, siendo este patrón modificado por las prácticas de manejo como la segregación y el destete precoz (Pijoan et al., 1997).

Por lo anteriormente mencionado el *Haemophilus parasuis* con buena razón, ha incrementado recientemente la atención de Veterinarios e Investigadores sobre la producción a diferencia de otros años.

Identificado tradicionalmente, como causa asociada al estrés, la poliserositis fibrinosa en cerdos jóvenes (Enfermedad de Glässer), el organismo nuevo ha sido identificado en animales viejos ingenuos (Inmunologicamente) e infectados, introducidos dentro de las granjas. Esta enfermedad a sido identificada como uno de los más serios problemas asociados con la mezcla de cerdos de varias granjas.

En esta situación, la poliserositis porcina clásica / artritis descubierta no está presente a menudo. (Gaylan et al, 1999)

Esta hipótesis se basa en:

- Los lechones son colonizados por la bacteria eliminada por sus madres a distintas edades (dependiendo del nivel de inmunidad materna y del nivel de excreción bacteriana de la cerda).
- A una cierta edad, por ejemplo, al destete, solamente una proporción de cerdos estarán colonizados (normalmente, mayor porcentaje de animales colonizados a mayor edad de destete).
- Cuando la proporción de cerdos colonizados al destete es baja, la transmisión del microorganismo de cerdos colonizados a no-colonizados en la transición será lenta.
- La proporción de cerdos infectados más tardíamente, en un momento donde ya no quede inmunidad materna, serán susceptibles a sufrir la enfermedad clínica.

Esta cascada de hipótesis abre nuevas vistas sobre la patogenia de algunas enfermedades bacterianas, y probablemente el término "patogenia de poblaciones" ofrece una aproximación más realista a la comprensión de cómo funcionan estas enfermedades en la granja, y de cómo cambian según el sistema de producción utilizado.

Por otro lado, el cambio a granjas de alta sanidad, conjuntamente con la mejora de las técnicas de diagnóstico, ha supuesto la "aparición" de nuevos procesos patológicos (o quizás "viejos" procesos patológicos que simplemente eran desconocidos hasta ese momento).

Dos puntos han coincidido:

1) Ambos son agentes que no suelen causar la muerte del animal, pero son muy fastidiosos y difíciles de eliminar (probablemente son buenos ejemplos de "aquello que se ve" después de eliminar "aquello que producía graves pérdidas al sistema") y 2) se han desarrollado productos vacunales/farmacológicos específicos para combatir estas infecciones. Este último punto ha supuesto una verdadera presión comercial de los laboratorios sobre los veterinarios y granjeros, hasta el punto de que la no-vacunación o medicación sistemática frente a estos agentes ha sido considerada como una "falta de conocimiento" del veterinario encargado de granja, en algunos casos.

Como hemos podido darnos cuenta la situación del Complejo Respiratorio Porcino en explotaciones con destete convencional es bastante compleja y esto se incrementa en aquellas explotaciones en las que se maneja el destete precoz separado (SEW) o el destete precoz medicado (MEW) ambas prácticas que van adquiriendo popularidad en nuestro país, razón por la cual debemos de tener claramente entendidos los problemas neumónicos con un buen diagnóstico, para tomar las medidas de prevención, y en el mejor de los casos determinar un buen tratamiento con medidas de manejo adecuadas, y así controlar y posiblemente eliminar el problema de nuestra explotación, por lo que es sumamente importante entender cómo y porque en las diversas granjas, los diferentes agentes infecciosos (tempranos y tardíos) están interrelacionando entre ellos.

En un destete precoz separado SEW o en un destete precoz medicado MEW practicado a 10 días o menores, el hato con una baja o variable inmunidad, la eliminación de la PCP será en algunos casos hasta en un 90%. ¿Y cómo saber el status inmune?, para esto, se tendrán que realizar estudios serológicos y microbiológicos de tipo horizontal y estratificado en la granja.

En un destete precoz separado SEW o en un destete precoz medicado MEW practicado a 16 días, la oportunidad de eliminación de la PCP será del 50%. ¿Y cómo saber el status inmune?, para esto, se tendrán también que realizar estudios serológicos y microbiológicos de tipo horizontal y estratificado en la granja.

En un destete convencional, por mucho que se practique a los 18 a 20 días, la oportunidad de eliminación en el caso de la PCP sería del 5%. Aquí el diagnóstico serológico y microbiológico es valioso solo para determinar el status inmune de la granja, de ahí que sea necesario tener una inmunidad de hato alta con vacunación. La forma de controlar la PCP, la neumonía enzootica, pasteurelisis pulmonar o enfermedad de Glasser u otras es por medio del diagnóstico serológico y microbiológico, este sistema de diagnóstico detecta una respuesta inmunológica de los cerdos que han estado con una infección pasada (Whittemore, 1988; Amass, 1998).



En el caso de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, esta no afecta por si sola una explotación porcina, el solo diagnóstico serológico/ microbiológico de ella sola no es suficiente, las otras enfermedades como Fiebre Porcina Clásica; Enfermedad de Aujeszky; PRRSv; Neumonía Enzootica y Enfermedad de Glasser contribuyen y complican el control y/o erradicación de la PCP, lo mismo está sucediendo con otros agentes infecciosos, ya sean primarios o secundarios (Ciprián, 1999).

Dentro de las principales enfermedades infecciosas que afectan a los cerdos, las afecciones respiratorias son las que causan mayor impacto y mayor dificultad para controlarlas y/o erradicarlas, a continuación, se presenta un anexo del *Haemophilus parasuis*.

Microorganismo	Edad inicial De detección	Duración de la Inmunidad materna calostrala (si/no: la inmunidad es protectora)	Edad cuando los signos clínicos son observados	Incubación	Reservorios	Forma de transmisión
Haemophilus parasuis	7 días	2 a 4 semanas (si)	2 semanas a 4 meses			Contacto directo Aerosoles Heces fecales

Modificado Amass, 1998

Las pruebas serológicas y microbiológicas por lo tanto deben de poseer una buena sensibilidad y especificidad, ya que en las granjas no se observa ningún problema que pueda hacer pensar que la PCP o la neumonía enzootica, o la pasteurelisis pulmonar o enfermedad de Glässer están presentes. La serología por ejemplo debería de utilizarse por lo tanto, entre otras, en las siguientes situaciones:

1. Confirmación de una infección crónica, previa evaluación de las lesiones pulmonares típicas.
2. Estudio de la cinética de anticuerpos en una granja infectada, para establecer programas de vacunación y/o medicación por vía oral (alimento/agua).
3. Identificación de maternidades infectadas en el caso de la compra de lechones para sistemas de tipo todo dentro, todo afuera. Este punto es importante, para la decisión de muestrear madres, se debe tener en cuenta que hay baja prevalencia, con títulos de anticuerpos bajos y por lo tanto se dificulta la interpretación (aquí la PCP deberá tratarse como una enfermedad de tipo individual, y muestrear a todas las marranas). En el caso de los lechones se deberán de muestrear antes y después del destete a partir de las 8 semanas de edad (dependiendo del sistema de SEW o MEW o convencional).
4. Verificación de la respuesta de anticuerpos frente a una vacunación (se deberá de tomar en cuenta que tipo de inmunógeno se está aplicando para interpretar los resultados serológicos con los diversos antígenos).
5. Estudios serológicos tendientes a un programa de erradicación (Gottschalk, 1998)

En la selección de la mejor prueba diagnóstica, existen numerosos criterios que determinan cual es la mejor prueba de diagnóstico para una situación dada e incluyen: COSTO, SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, RAPIDEZ y DISPONIBILIDAD. Todos esos criterios pueden ser correlacionados a la situación específica. (Zeman, 1997).

Los laboratorios dedicados al servicio de la industria porcina, que cuentan con una buena infraestructura diagnóstica, como son los laboratorios de diagnóstico de los Estados Unidos (Zeman, 1997) y probablemente algunos de Salud Animal de México (Valdivia et al, 1997) están enfocados básicamente entre otros, a estos objetivos:

- a) Identificar la causa precisa del brote agudo de la enfermedad (desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la elaboración de seroperfiles), lo cual permite precisar los métodos de control, para ser rápidamente implementados; permite coleccionar datos de la enfermedad, para establecer las estrategias de los cambios de manejo, que permitirán prevenir el mismo problema, en el siguiente ciclo de producción
- b) Identificar y eliminar a los animales expuestos conocidos (aplicando la serología ampliamente) para erradicar ciertas enfermedades reguladas por el Gobierno Federal (como es el caso de la Brucelosis)

Las reglas de oro para el Dr. Zeman (1997) y que muchos patólogos y microbiólogos compartimos para el diagnóstico de una enfermedad clínica es:

1º. Identificar las lesiones patológicas que expliquen la aparición de los signos clínicos.

2º. Identificar los patógenos o factores (traumas, toxinas, medio ambiente entre otros) que son conocidos y que están produciendo estas lesiones.

La identificación en ambos casos es crítica, ya que actúan en forma sinérgica para producir un diagnóstico definitivo. La investigación de las enfermedades infecciosas, con solo la observación de las lesiones sin el soporte microbiológico, restringe considerablemente las posibilidades del diagnóstico, así un diagnóstico definitivo por solo las lesiones no puede ser posible.

EJEMPLO: Meningitis purulenta en cerdos de 2 semanas de edad: Meningitis bacteriana. Para el diagnóstico definitivo es necesario realizar cultivos para identificar a: *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Escherichia coli* y otros patógenos. Si fuera al contrario, la identificación de estos agentes (aun aplicando las técnicas de PCR) y que no correspondieran a las lesiones patológicas encontradas, es solo la identificación de potenciales patógenos que son ubicuos en la pira y en las instalaciones (Zeman, 1997).

Si la razón de la prueba de diagnóstico es algo (herramienta diagnóstica) para el diagnóstico clínico, muchas veces es muy importante clarificar la meta precisa de la prueba. Si se desea determinar el ambiente limpio de una enfermedad dada, varios factores deben ser considerados en la prueba diagnóstica, como serían: SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, NIVEL DE PREVALENCIA ESPERADA y NIVEL DE CONFIANZA SATISFACTORIA.

a) Sensibilidad: Es la habilidad de una prueba para detectar a TODOS los verdaderos positivos.

b) Especificidad: Es la habilidad de una prueba para detectar SOLO a los verdaderos positivos.

Si la prueba es 100% sensible no presentaría falsos negativos (no falla para detectar a los verdaderos positivos); si la prueba es 100% específica no presentaría falsos positivos (no falla para detectar a los verdaderos negativos). Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad van de la mano, es decir cuando se afecta uno también el otro. El efecto esperado es cuando aumenta la sensibilidad, puede disminuir la especificidad o bien cuando aumenta la especificidad, puede disminuir la sensibilidad. Si fuera 100% sensible y 100% específica se estaría frente a una prueba perfecta. Desafortunadamente existen pocas pruebas perfectas en el mundo, y se tiene que determinar un cierto nivel de aceptabilidad, como ocurre con el PCR.

El nivel de aceptabilidad está relacionado a la pregunta específica que se intenta responder. Si la decisión a tomar es la erradicación de una enfermedad dada, la Normas Oficiales indican que la prueba debe de tener una alta sensibilidad, para identificar a los infectados en forma individual. La prueba más sensible sería preferida, si la especificidad estuviera insignificadamente comprometida, ya que durante la erradicación un falso positivo raro (verdaderamente negativo) sería mejor para el proceso del mismo, que un falso negativo raro (verdaderamente positivo), ya que estos animales falsos negativos estarían diseminando la enfermedad en la demás población, y afectaría seriamente el proceso de erradicación (Zeman, 1997).

En general, la SENSIBILIDAD de una prueba es de suma importancia, cuando los animales probados y resultaron positivos fueron los que produjeron la enfermedad en la pira sana y limpia, y fueron los que causaron el brote. Así. la ESPECIFICIDAD se convierte de suma importancia, cuando hay interés que un falso positivo no ponga fin a la utilidad de un animal valioso (Zeman, 1997).

El costo de las pruebas de laboratorio en medicina veterinaria (sobretudo en la producción animal: cerdos) es siempre un problema, en algunas ocasiones el costo de \$10.00 dólares por prueba, puede ser útil, sin embargo, el costo de \$25.00 dólares por prueba, afectaría seriamente la economía de la producción animal. En otras ocasiones el costo de \$50.00 dólares por prueba, puede ser de gran utilidad por la prevención de pérdidas económicas.

Ahí es donde se tiene que tener muy claro, que pregunta específica se quiere contestar con la prueba a utilizar y que a la vez sea económica. La popularidad de la prueba afecta también el precio, una demanda de la prueba hace que el laboratorio, se equipe y adquiera los reactivos necesarios para llevarla a cabo y la hace menos cara. De ahí, que los laboratorios estén considerando el costo de las nuevas pruebas y las estén comparando con el costo de las viejas pruebas, y a la vez estén analizando las ventajas y desventajas de las mismas (Valdivia et al., 1997; Zeman, 1997).

Las técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico microbiológico de las enfermedades respiratorias. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica usada para amplificar regiones específicas del ADN. Los principios de esta técnica fueron descritos primeramente en 1971 pero no fue hasta los años 80s que la técnica fue adaptada y desarrollada completamente. En aquella época esta técnica constituyó una señal muy importante de avance en la biología molecular ya que permitió la gran producción de segmentos específicos del ADN. Esta técnica se basa en el hecho de que ciertas secuencias de una región dada de la molécula del ADN son conocidas (Gingold, 1990).

Por lo tanto PCR se utiliza para amplificar la región entre dos secuencias conocidas. El producto amplificado se puede detectar por diferentes métodos, variando en sensibilidad, exactitud y viabilidad para el diagnóstico de laboratorio, como son: el corrimiento en gel de agarosa, Southern Blot, microtítulo en microplacas y la detección directa de tiempo real de los productos en el tubo de PCR visualizado por fluorescencia (Mathew, 1990. Higushi et al., 1993).

La técnica de PCR se puede utilizar para identificar microorganismos causantes de enfermedad y de suma importancia en medicina en donde es necesario un diagnóstico rápido. Hoy en día el PCR no se puede considerar como sustituto de la bacteriología clásica. PCR es de inferior sensibilidad a los métodos clásicos cuando las bacterias tienen crecimiento rápido, no obstante tiene muchas ventajas al detectar microorganismos de crecimiento lento o cuando la detección se lleva a cabo en muestras contaminadas. Una de las ventajas más evidentes de la técnica de PCR es la rapidez de los resultados y de que se pueden trabajar muchas muestras. Con la bacteriología tradicional se necesita un mínimo de 2 días para alcanzar un diagnóstico rápido. Pero en el caso del PCR, solamente algunas horas son necesarias. Por lo tanto, las bacterias de lento crecimiento, o bacterias no cultivables, virus, así como hongos, son los mejores candidatos para ser detectados por PCR (Calsamiglia, 1999; Calsamiglia et al., 1999).

Como ventajas del PCR es la variedad de aplicaciones, y tradicionalmente se ha utilizado como una herramienta de diagnóstico para detectar ciertos microorganismos específicos en muestras clínicas. El PCR también puede utilizarse para realizar estudios epidemiológicos y llevar a cabo una vigilancia epidemiológica en las granjas animales. Otra importante aportación del PCR es que permite la detección de los animales que son portadores de cierta enfermedad (Calsamiglia, 1999; Mendoza et al., 1999).

Como desventajas del PCR. La detección de falsos negativos: Si los iniciadores no son específicos, si la concentración de los componentes no están estandarizados y las condiciones de la reacción no están claras podrían obtenerse resultados falsos negativos. Con respecto a los resultados falsos positivos: Si los iniciadores son homólogos a las secuencias pero no al gen blanco o si los productos y soluciones están contaminadas con reacciones anteriores, entonces se podrían presentarse falsos positivos (Calsamiglia, 1999). Por lo que el PCR detecta ADN pero no la distingue entre los microorganismos vivos y muertos, ni tampoco detecta sensibilidad a antibióticos, también el costo es un inconveniente en comparación con el diagnóstico microbiológico o serológico.

El diagnóstico rutinario para algunos laboratorios de enfocan a los siguientes microorganismos. *Pasteurella multocida* se detecta toxina positiva DNT (+); *Mycoplasma hyopneumoniae* (nested-PCR); *Streptococcus suis* y *Haemophilus parasuis* (rep-PCR) y PRRSv (Taqman). Éstos son los agentes principalmente implicados en el Complejo de la Enfermedad Respiratoria de los Porcinos (PRDC). Este síndrome es cada vez más importante la causa de una baja productividad de los cerdos, caracterizado por un crecimiento lento, la baja eficacia alimenticia, anorexia, tos y disnea, donde están implicados los microorganismos antes de mencionados (Calsamiglia, 1999; Calsamiglia et al., 1999; Dee, 1996; Lichtensteiger et al., 1996).

En el caso de *Streptococcus suis*. y de *Haemophilus parasuis* la técnica de rep-PCR ha mostrado resultados muy útiles para el estudio de la epidemiología en las piaras. La técnica rep-PCR identifica cepas individuales, aún del mismo serotipo (Torremorrell, 1999). Hemos demostrado que la mayoría de los brotes de la enfermedad en granjas son debidos a una sola cepa. También esta técnica nos ha permitido observar la transmisión de estas cepas entre granjas (Mendoza et al., 1999).

Sistema rápido para el diagnóstico serológico de App- Hps-Pm-Mh Denominado NEUMOTEST®. (Marca Registrada UNAM). (Ciprián, et al. 1999)

## 1. METODOS DE DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS BACTERIANAS EN MÉXICO.

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

- a) Observación de los signos clínicos en el cerdo y en los de la zahúrda, este método no es confiable, ya que solo los signos clínicos que se presentan en cursos agudos de las afecciones respiratorias, permiten identificar a la PCP, quizás a la EG, mientras que en los casos crónicos de la misma PCP y EG, además de la NE y PP pasan inadvertidos, y solo se reflejan en los parámetros de la Ganancia Diaria de Peso (GDP) y Conversión Alimenticia (CA).
- b) Observación de las lesiones a la necropsia de los animales muertos de los casos agudos o durante la inspección de las canales, en los centros de abasto de los casos crónicos. Para el estudio patológico se requiere de los servicios de un Médico Veterinario especialista en Patología, y aunque algunas lesiones son propias de la PCP se pueden confundir con EG, no así con NE y PP, sin embargo, no podemos identificar a los serotipos prevalentes en las zahúrdas de una misma granja.
- c) Aislamiento, identificación y tipificación de los microorganismos presentes en los pulmones de los cerdos con problemas agudos o bien crónicos. Este proceso tarda de 48 a 72 horas en el mejor de los casos, como sería con *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*; pero es lento en el caso de *Haemophilus parasuis*, y más lento para *Mycoplasma hyopneumoniae*. Para realizar estas técnicas es necesario contar con un laboratorio bien establecido, en donde además de contar con los reactivos, medios de cultivo y antisueros conocidos, se requiere del personal calificado, y en México existen pocos laboratorios que brindan este servicio.
- d) El diagnóstico serológico se lleva a cabo en los cerdos vivos de las granjas o en los cerdos en los centros de abasto. El método serológico es uno de los más adecuados, ya que se puede realizar en los animales vivos con y sin signos clínicos, no requiere del sacrificio de los cerdos, es más rápido y nos permite hacer perfiles de la enfermedad, identificando el punto de infección en la granja, además permite identificar los serotipos prevalentes. Para el diagnóstico serológico de la PCP, NE, se encuentran algunas pruebas tales como; aglutinación, aglutinación con partículas de látex, aglutinación lenta en tubo; aglutinación lenta en tubo con 2-mercaptoetanol, hemoaglutinación indirecta, fijación de complemento y ELISA entre otras. Pocas de estas pruebas se realizan en México, y las que se utilizan son más para estudios de investigación que para diagnóstico, debido principalmente a la falta de infraestructura, equipo, y personal capacitado, que solo los laboratorios de las Universidades e Institutos cuentan (Ciprián et al., 1990).

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

paquete tecnológico denominado NEUMOTEST® App; -Pm; -Mh; -Hps (mr: marca registrada por la UNAM), que permitirá conocer la situación de la granja con respecto a la enfermedad, permitirá conocer mediante los perfiles serológicos los puntos de infección o las ventanas inmunológicas y así poder establecer las medidas de control necesarias.

## 2. RESUMEN DE LA INVENCION.

El paquete tecnológico NEUMOTEST® App; -Pm; -Mh; -Hps (mr: marca registrada por la UNAM), consiste en un método rápido que no requiere equipo de laboratorio, se realiza en unos minutos y solo requiere de pocos mililitros de suero del animal a estudiar, por lo que no se necesita de personal calificado. El método rápido es un ensayo de diagnóstico serológico por medio de una prueba de aglutinación directa en placa, que ofrece la única oportunidad de distinguir directamente en la propia granja, si un cerdo ha sido infectado o si el cerdo está sano.

NEUMOTEST® App; -Pm; -Mh; -Hps (mr: marca registrada por la UNAM), es una prueba de aglutinación en placa destinada a identificar directamente anticuerpos (de la clase IgG de alta afinidad) capsulares de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotipos 1 al 12); anticuerpos (clase IgG) LPS de *Pasteurella multocida* y anticuerpos (clase IgG) capsulares de *Haemophilus parasuis* y anticuerpos IgG contra *Mycoplasma hyopneumoniae* presentes en el suero de cerdos de cualquier edad.

El paquete tecnológico consiste en un estuche portátil diseñado para diagnosticar cerdos infectados con *Pasteurella multocida* (Pasteurelisis Pulmonar, PP); *Mycoplasma hyopneumoniae* (Neumonía Enzoótica, NE); *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, PCP) y *Haemophilus parasuis* (Enfermedad de Glasser, EG). El sistema rápido de diagnóstico serológico se realiza mediante las pruebas de aglutinación o de aglutinación en látex que permite hacerlo en la misma explotación porcina y además de que distingue en los casos de *Pasteurella multocida* (Pasteurelisis Pulmonar, PP); *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, PCP) y *Haemophilus parasuis* (Enfermedad de Glasser, EG), si los cerdos están infectados y en el caso de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Neumonía Enzoótica, NE) determinar los puntos de infección mediante el uso de perfiles serológicos.

El sistema de diagnóstico serológico es un estuche que contiene los antígenos, para realización de las pruebas serológicas; estos antígenos varían desde de *Pasteurella multocida* (tipos capsulares A y D comunes); *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotipos capsulares: 1, 2, 3, 4,5a, 5b, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12); *Haemophilus parasuis* (serotipos capsulares: de alta virulencia ++: 1, 5, 10, 12, 13 y 14; o bien serotipos de relativa virulencia +: 2, 4 y 15); hasta el de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

El método para diagnosticar la pasteurelisis pulmonar, la pleuroneumonía, la enfermedad de Glasser o la neumonía enzoótica comprende los pasos de preparar un reactivo de aglutinación o de aglutinación en látex; de estabilizar el reactivo utilizado, a temperatura ambiente en un tiempo corto; de depositar enseguida el suero de muestra en una de las celdas de la placa de prueba; incorporar el reactivo de aglutinación o de aglutinación en látex a la muestra y mezclar enseguida, enseguida se someten los resultados a un método comparativo de interpretación cualitativa, en donde la muestra celda de cerdos infectados presenta un aspecto grumoso, en tanto que la celda de cerdos sanos o vacunados (siempre y cuando no sean recién vacunados, es decir después de 15 días posvacunación), aparecerán sin grumos.

Otro de los objetivos de la invención es proporcionar un equipo y método en donde los reactivos utilizados permiten que el diagnóstico de las enfermedades respiratorias bacterianas sea de fácil operación y eficiente por no presentar falsos negativos, permitiendo el manejo de los animales sanos de la granja cuando se utiliza como prueba tamiz de monitoreo. Otro más de los objetivos de la invención es que solo se requiere de una mínima parte del suero para efectuar el diagnóstico y por lo mismo se pueda aplicar a una granja completa, lo que permite evaluar el status inmune de la granja valorando e interpretando los seroperfiles.

## 1.8.- TRATAMIENTO

En casos tempranos, se pueden utilizar con éxito el tratamiento parenteral con penicilina, amoxicilina, ampicilina, oxitetraciclina, enrofloxacin y sulfamidas - trimetoprim. El tratamiento debe de realizarse de forma temprana, especialmente en los casos de meningitis. Es básico identificar el comienzo de la enfermedad. La medicación con agua de bebida durante tres días con Amoxicilina (250 gramos / 1000 litros) seguida de una medicación durante una semana con fenoximetil penicilina en la ración (250 gramos / ton) da buenos resultados en casos graves. (Rodríguez et al. 2000).

El uso profiláctico de antibióticos o de medicación oral terapéutica puede ser de poco valor en brotes severos de *Haemophilus parasuis* (Madsen 1984; Wiseman et al. 1989; Menard y Moore 1990).

Las altas dosis de antibiótico deben ser administradas parenteralmente tan pronto como los signos clínicos se hayan manifestado, y todos los cerdos en el grupo afectado, y no justo con esos signos observados, deben ser tratados (Desrosiers et al. 1986).

La penicilina se ha considerado la droga de opción, pero un aumento en la resistencia a la penicilina ha sido reportada (Kielstein y Leirer 1990). La mayoría de las cepas de *Haemophilus parasuis* son también sensibles *in vitro* a la ampicilina, a la fluoroquinolona, a las cefalosporinas, a la gentamicina, a la spectinomycina, y a las sulfas reforzadas; Un gran número de cepas son resistentes a la tetraciclina, a la eritromicina, y a otros aminoglicosidos, y lincosamida (Kielstein 1985; Trigo et al. 1996).

El uso profiláctico de antibióticos durante el periodo de riesgo evita la presentación de brotes severos de la enfermedad.

Los antimicrobianos de primera elección son: PRIMECIN, FLORTEC y SULFATROPIN, también ESTREPTOPEN, LAPIPEN, FLUPEN, AMPIPEN, DIRAMOX, MINOXEL, MINOXEL PLUS tienen buena actividad contra *Haemophilus parasuis*. (Orozco, V.; Flores, V).

PRENICEF 5 g 3 a 5 mg/ kg de peso vivo (1 ml por 20 a 33 kg de peso). PRENICEF RTU 3 a 5 mg/ kg de peso vivo (1 ml por cada 10 a 16 kg). PIRODEX AVANDAL DIFAS Dosis para un cerdo de 50 kg: 1 sobre de 10 g (10 mg/kg) de peso vivo. DOXIMINA 1 ml por cada 5 a 10 kg de peso corporal (5 a 10 mg/kg) cada 12 a 24 horas, dependiendo del caso clínico a tratar desde 3 días a 8 días.

NEUMOXOL 1ml/ 20 a 40 kg de peso corporal. (2.5 a 5 mg/ kg) Durante 3 a 5 días pudiendo ampliarse la duración del tratamiento a criterio del Médico Veterinario. TILAX 10 a 20 mg /kg de tilosina lo que equivale a 1 ml por cada 10 a 20 kg de peso corporal cada 12 a 24 horas por un periodo de 3 a 5 días. <http://www.arandalab.com.mx/CUADRO%20PORCINOS.asp>

## 1.9.- PREVENCIÓN E INMUNIDAD

En los casos en los que los lechones lactantes se vean afectados, se puede prevenir la enfermedad: Inyectando las cerdas con penicilina o amoxicilina o ampicilina en el momento del parto o bien medicando el pienso (7 días antes del parto y 7 días después) con fenoximetil penicilina o amoxicilina o ampicilina.

En los casos de expresión de enfermedad en lechones destetados y/o engorde: Mediar raciones de lactación, iniciador de destete y/o entrada de engordes con (200 - 250 gramos / ton) de fenoximetil penicilina ó (300 gramos / ton) amoxicilina o ampicilina.

Inyectar todos los lechones dos días antes de la incidencia y el día de mayor incidencia de la enfermedad con Penicilina retardada.

Realizar medicaciones pulsátiles (tres días a la semana) dos semanas antes y después del período de mayor incidencia con Amoxicilina en el agua de bebida.

En todos los casos de medicación con antibióticos prestar especial atención al período de retirada de los mismos para evitar residuos en carne (especialmente en las cerdas y en lechones vendidos como tostones).

La mucosa nasal de los lechones se puede colonizar antes de la 1ª semana de edad, la eliminación del *Haemophilus parasuis* en el destete temprano es poco probable se lleve a cabo. Clark *et al.* (1994) se evaluaron varias estrategias medicinales del destete precoz y encontraron que el *Haemophilus parasuis* podrían ser eliminado solo cuando la administración parenteral y oral de altas dosis de antibióticos a los lechones era una parte del tratamiento.

La eliminación del *Haemophilus parasuis* de una granja puede no ser deseable, ya que al mezclarse subsecuentemente los cerdos no contaminados con los cerdos que abrigan al *Haemophilus parasuis* durante fases posteriores en la producción puede dar paso a la enfermedad con la devastación y en pérdidas económicas.

La introducción de animales reproductores nuevos de una granja con un estado de salud diferente, como prevención incluye el aislamiento, con períodos de largo tiempo para la aclimatación para permitir desarrollar la inmunidad protectora por vacunación o por la exposición natural.

La inmunidad maternal y natural son factores críticos para controlar el proceso de la enfermedad (Nielsen y Danielsen 1975). Los cerdos expuestos previamente a la cepa no patogénica del *Haemophilus parasuis* desarrollan resistencia al desafío subsecuente con las cepas virulentas (Nielsen 1993).

La vacunación de cerdas jóvenes dio lugar a la inmunidad maternal protectora por hasta 4 semanas en que los lechones fueron desafiados con los mismos serotipos contenidos en la bacterina (Solano *et al.* 1998). Debido a la naturaleza septicémica de la enfermedad, los anticuerpos son probablemente el mecanismo inmune protector más importante.

Hay numerosos informes del acertado control de la enfermedad por vacunación con la comercial bacterinas manada-específicos (Nielsen y Danielsen 1975; Riising 1981; Wiseman *et al.* 1989; Menard y Moore 1990; Schimmel *et al.* 1992), Allí son también casos donde no son eficaces los bacterinas, y éstos pueden ser debido a la carencia de la protección cruzada para la cepa o el implicado serotipo en el proceso de la enfermedad.

La protección cruzada contra otras cepas virulentas no son siempre evidentes en modelos de desafío experimental (Miniats *et al.* 1991; Kielstein y Raßbach 1991; Rapp-Gabrielson *et al.* 1997). Aunque la protección cruzada es sobre todo una preocupación por las bacterinas comerciales, las bacterinas manada-específicos les puede también faltar eficacia debido a la presencia de más de una cepa o serotipo o de la introducción subsecuente de una nueva cepa en la manada. La demostración que la cepa virulenta puede no proteger contra en el desafío contra diversas cepas heterólogas y homologas del mismo serotipo, o aún el desafío contra cepas homólogas, indica que los antígenos protectores pueden no ser idénticos al factor de la virulencia o a los antígenos tipo-específicos (Kielstein y Raßbach 1991; Rapp-Gabrielson *et al.* 1997).

La eficacia en el desafío contra diversas cepas del mismo serotipo, así como la protección cruzada contra algunos serotipos heterólogos, ha sido demostrada con una bacterina que contenía los serotipos 4 y 5 de *Haemophilus parasuis*. (Rapp-Gabrielson *et al.* 1996.1997). Sin embargo, en estos mismos informes, la evaluación de este bacterina, así como otros bacterinas comerciales, demostraron que ninguna protegía completamente contra los seis serotipos más frecuentes asociados a enfermedad en Norteamérica. Las cepas que representaban nueve serotipos, así como cepas no tipificables, se ha demostrado que son virulentas. Debido a la heterogeneidad de las cepas con potencial patógeno y la carencia actual de la comprensión de la protección antigénica y de factores de virulencia, es inverosímil que cualquier bacterina proporcionará inmunidad cruzada contra todas las cepas de la significación etiológica en la población de cerdos.

Los programas del control pueden incluir vacunas y tratamientos con antibióticos pero también como práctica de gerencia del direccionamiento para reducir o eliminar otros patógeno respiratorios, de ajustar la edad del destete y el movimiento de los cerdos, y de eliminar mezclas de cerdos en todas las etapas de la producción.

## 1.10.- NORMAS DE MANEJO

La primera medida de prevención es la práctica de un manejo sanitario correcto.

Las recomendaciones en este apartado son las siguientes:

- Realizar un adecuado programa de adaptación sanitario en cerdas primerizas que posibilite el contagio paulatino en un adecuado local de adaptación sanitario.
- Lavar las cerdas antes de entrar en la sala de parto.
- Controlar que cada lechón reciba la máxima cantidad de calostro al nacer (los anticuerpos son posiblemente el principal mecanismo de inmunidad protectora).
- Proporcionar una buena higiene y manejo dentro de la sala de parto.
- Practicar siempre el sistema todo dentro/ todo fuera estricto en maternidad, destete y engorde.
- Utilizar rejillas de plástico en destete.
- Controlar de forma intensa la temperatura ambiente ( temperatura confort ) durante los primeros 3 días posparto, 5 días posdestete y 10 días después de la entrada en engorde. Mantener a los cerdos por encima de la temperatura crítica inferior. Utilizar un adecuado aislamiento en las paredes de las naves. (Fig. 15, 16, 17, 18 y 19)
- Suministrar un mínimo de 0,22 m<sup>2</sup>/ lechón en el destete y 0,75 m<sup>2</sup>/cerdo de engorde.
- En engordes con ventilación natural disponer un mínimo de 3,3 m<sup>3</sup>/cerdo.
- Suministrar un caudal constante de agua durante el destete de 750ml/min. en cazoleta (una cazoleta cada 10 - 15 lechones).
- Comprobar si el peso de los animales a la entrada en un local es adecuado para soportar el ambiente, el tipo de alojamiento y el tipo de suelos.
- Evitar las corrientes de aire.
- Evitar ambientes con bajas temperaturas y humedad.
- Mantener el ambiente con una temperatura elevada y baja humedad o viceversa.
- Mantener los niveles de contaminación ambiental.
- Evitar la mezcla de animales de diferentes orígenes sanitarios en la fase de engorde.

## 1.11.- ERRADICACIÓN

Se trata de un germen ubicuo: se encuentra distribuido por todo el mundo y está presente incluso en las granjas de alto estado sanitario.

Es realmente difícil conseguir la erradicación de la enfermedad en lechones de cerdas portadoras. La eliminación de *Haemophilus parasuis* con la práctica de un destete precoz es prácticamente imposible dado que la contaminación de las mucosas de los lechones recién nacidos se produce incluso antes de la primera semana de vida.

La práctica de la despoblación - repoblación puede contemplarse siempre que los lechones producidos después de la repoblación no se mezclen con animales portadores ya que en el caso de tener contacto con animales "contaminados" en alguna de las fases productivas los efectos pueden ser devastadores.

## 1.12.- HIPÓTESIS

Se tendrá a partir del cultivo bacteriano de *Haemophilus parasuis* un antígeno, entonces se obtendrá una prueba serológica de la enfermedad de Glässer en cerdos.



## **2.- OBJETIVO**

### **2.1.- OBJETIVO GENERAL**

Obtener y evaluar un antígeno a partir de *Haemophilus parasuis* para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Glässer en cerdos en una granja, (estudio preliminar).

### **2.2.- OBJETIVOS PARTICULARES**

- 2.2.1.-** Obtener la biomasa de *Haemophilus parasuis* a partir de diferentes medios de cultivo, para tener el mejor rendimiento bacteriano posible.
- 2.2.2.-** Realizar el acondicionamiento de la biomasa de *Haemophilus parasuis* para obtener un antígeno con una tinción.
- 2.2.3.-** Evaluar el antígeno obtenido con muestras de sueros de animales procedentes de diferentes granjas, mediante la técnica de aglutinación en placa.

### 3.- MATERIALES Y METODOS

#### 3.1.- Cepas.

##### Cepa 1:

Se utilizó para este trabajo una cepa de *Haemophilus parasuis* serotipo 5 denominado Nagasaki, enviada por el CINVESTAV; a la cual se le realizaron las pruebas Bioquímicas primarias y secundarias correspondientes para su identificación.

##### Cepa 2:

*Staphylococcus aureus* como cepa nodriza para realizar la prueba de satelitismo por la dependencia de *Haemophilus parasuis* al Factor V, Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD).

#### 3.2.- Obtención de los sueros de cerdo para las pruebas serológicas.

Los sueros utilizados para llevar a cabo las pruebas de aglutinación en placa, fueron obtenidos en 714 sueros de cerdos de los cuales 664 fueron de animales de campo, muestras obtenidas en Chiapas en granjas de tras patio y granjas de producción por todo el estado con la colaboración de la Universidad Autónoma de Chiapas y 50 de un proyecto de investigación en el centro de investigación de Palo Alto Edo. de Méx.

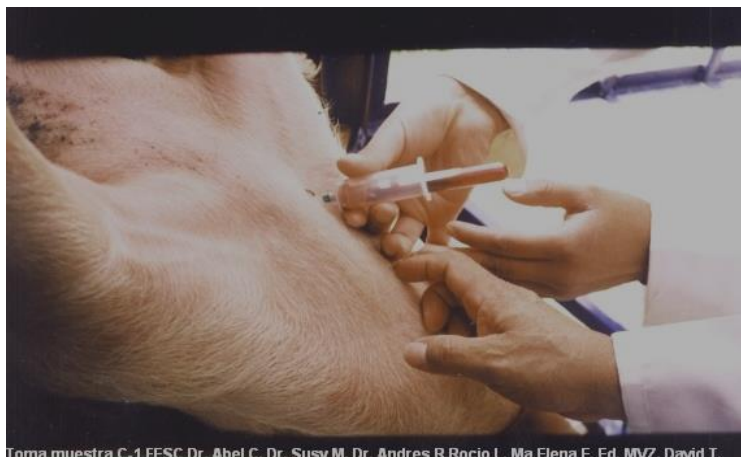


Figura 3.1: Toma de muestra, FES-C C1, Dr. Abel C, Dr. Susana M, Dr. Andrés R, Rocio L, Ma. Elena E, Edic. MVZ. David T.

#### 3.3.- Controles (+) y (-).

Se utilizaron como referencia sueros de cerdos vacunados con bacterina de *Haemophilus parasuis* Control (+), y suero de cerdos SPF (libres de patógenos específicos) como Control (-). Los controles negativos fueron de los cerdos SPF de los cuales antes de ser vacunados con la bacterina se tomaron muestras de suero y se realizaron titulaciones de anticuerpos. (Suero inicial, Anticuerpos de *Haemophilus parasuis*, cero).

#### 3.4.- Aislamiento.

La cepa de *Haemophilus parasuis* se sembró en un medio de Agar Sangre y en Agar PPLO con estría de *Staphylococcus aureus* (para brindarle el factor V (NAD) de crecimiento) y observar crecimiento satelital que es una de las pruebas principales de identificación.

Una vez sembradas las cajas se colocan en la estufa de incubación a 37 °C por 48 hrs, monitoreando el crecimiento cada 24 hrs, hasta observar el crecimiento bacteriano.

Una vez obtenido el crecimiento del *Haemophilus parasuis* en el Agar PPLO se hace un pase sembrando por dilución en medio Agar PPLO enriquecido con Extracto de Levadura (EL) al 10%, para dar el Factor V (NAD) y aislar la bacteria pura del Agar PPLO; se incuba a 37 °C por 48 hrs, para obtener un sembrado masivo.

Al mismo tiempo del aislamiento se prepararon pruebas bioquímicas Primarias y Secundarias, y se incubaron a 37 °C por 24 hrs. Para prueba de esterilidad.

### 3.5.- Identificación.

La identificación del *Haemophilus parasuis* se realizó por medio de Pruebas Bioquímicas Primarias y Secundarias que se mencionan en la bibliografía (Rodríguez F. *et al* 2002).

**Tabla 3.** Características metabólicas principales de *Haemophilus parasuis*.

Determinación	Resultado	Determinación	Resultado
Prueba de satelitismo o Dependencia del factor V (NAD).	⊕	Ácido de arabinosa	⊖
Hemólisis	⊖	Ácido de melibiosa	⊖
CAMP	⊖	Ácido de trehalosa	⊖
Ureasa	⊖	Ácido de celobiosa	⊖
Oxidasa	⊕/⊖	Ácido de rafinosa	⊖
Catalasa	⊕	Ácido de lactosa	⊖
ONPG	⊕	Ácido de manitol	⊖
α-Fucosidasa	⊕	Ácido de la galactosa	⊕
Producción de indol	⊖	Ácido de la glucosa	⊕
Crecimiento en agar MacConkey	⊖	Ácido de la manosa	⊕
Reducción de Nitratos	⊕	Ácido de la maltosa	⊕

Rodríguez Ferri, *et al*, 2002.

### 3.6.- Obtención de la Biomasa de *Haemophilus parasuis*.

Se preparan matraces de 1000 ml con caldo de cultivo PPLO enriquecido con (EL) para proporcionarle el Factor V para crecer el *Haemophilus parasuis*, se coloca el caldo en la estufa de incubación a 37 °C por 24 hrs para prueba de esterilidad se procedió a la inoculación del caldo PPLO+EL.

La inoculación se llevó acabo en la campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad, con una jeringa estéril y con el mismo caldo se lava el agar para obtener una suspensión bacteriana con la cual se inoculo el caldo enriquecido. Una vez inoculado, el caldo se coloca a incubar en un baño maría a 37 °C por 48 hrs. Este proceso se lleva a cabo hasta obtener la cantidad de biomasa necesaria para su acondicionamiento en la preparación del antígeno.

Los medios utilizados para preparar el caldo de cultivo de las bacterias contenía nutrientes como: Infusión de carne de corazón, Peptona, Agar, Cloruro de Sodio, Extracto de Levadura Etc.



Figura 3.2.- Preparación de Antígeno de *Haemophilus parasuis*, FES-C C1, QFB. David Oliva y QFB. Rogelio Hernández.

### 3.7.- Metodología para la preparación del antígeno de *Haemophilus parasuis*.

Al obtener la cantidad suficiente de Biomasa requerida de *Haemophilus parasuis* en el caldo PPLO+EL se procedió a la preparación del antígeno en la siguiente forma. Se pesan los frascos donde se va llevar a cabo la centrifugación para que por diferencia del peso final se pueda saber la cantidad de biomasa obtenida; se procede a centrifugar (6000 rpm, 40') el caldo de cultivo PPLO inoculado con *Haemophilus parasuis*. Para conocer la biomasa se utiliza la siguiente formula [(Biomasa = Peso con masa - Peso sin masa) Peso con o sin masa se refiere a los contenedores donde se centrifugo el caldo]. El paquete obtenido se resuspende con Solución Salina Fisiológica (SSF), con dos granos de (KCl) y se deja reposar por 24 hrs. Después se utiliza el colorante Rojo de Fenol (RF) para teñir la Biomasa, se deja en agitación por 24 hrs, a 4 °C, después de transcurrido este tiempo se centrifuga y la pastilla obtenida se lava; por último se resuspende la pastilla con Buffer Básico y se deja a una concentración del 8% y se encuentra listo el antígeno. (Juárez I.M. 2002).

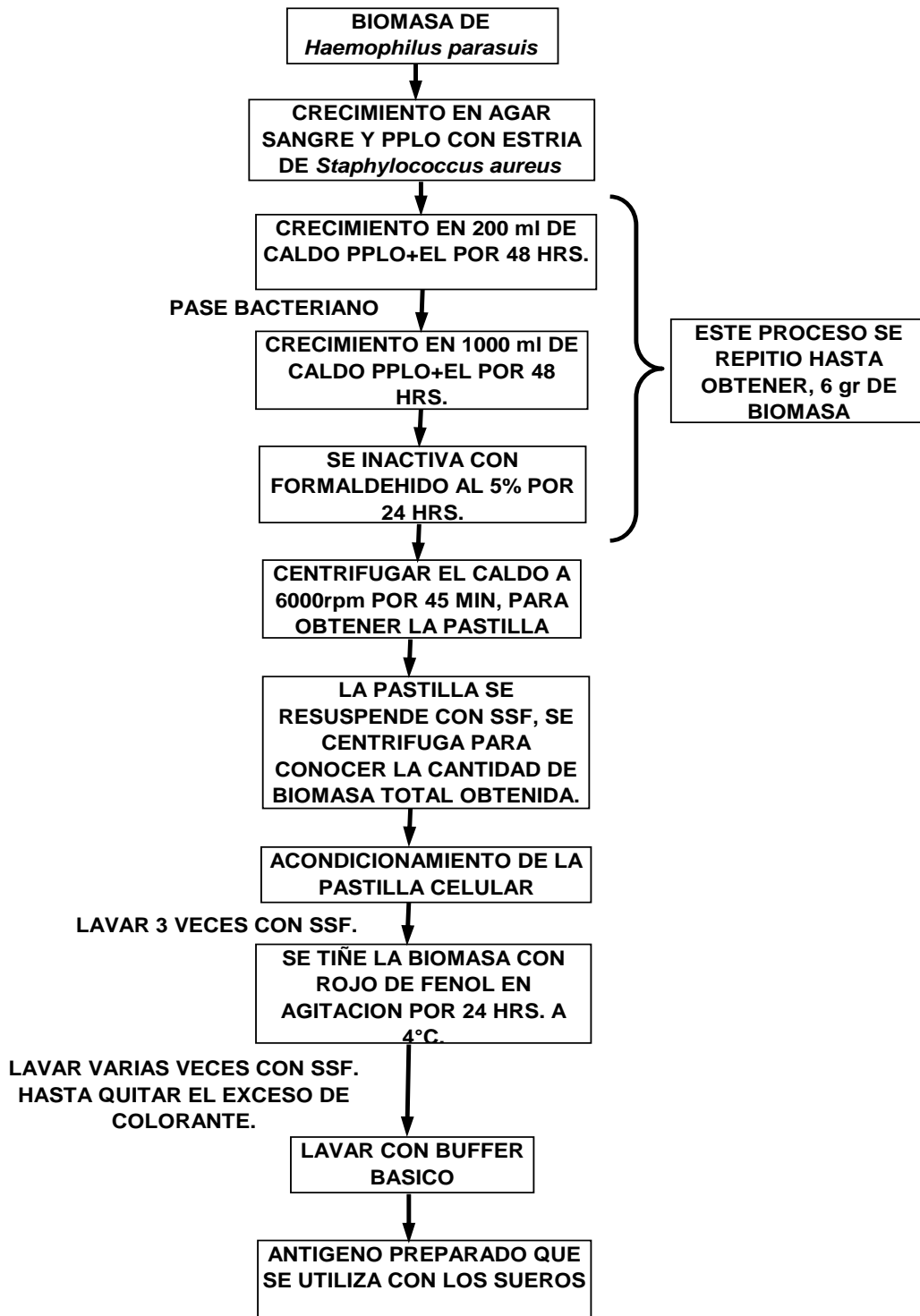


Figura 3.3: Diagrama de flujo.

### **3.8.- Evaluación de las muestras serológicas.**

Una vez obtenido el antígeno de *Haemophilus parasuis*, se realizó un muestreo de forma aleatoria en granjas en el estado de Chiapas de donde se obtuvieron 664 muestras de cerdos en diferentes edades; y 50 muestras del centro de Investigaciones del INIFAP en Palo Alto, todos los cerdos muestreados aproximadamente de 3 meses de edad, de estas muestras se obtuvo el suero para llevar a cabo las pruebas de aglutinación en placa.

### **3.9.- Obtención y diagnóstico en muestras de suero.**

Para la obtención de las muestras de suero, primero se coloca al cerdo en posición como se muestra en la figura 3.1, una vez sujeto el animal se palpa la vena cefálica, se desinfecta el lugar de la punción con Etanol utilizando una torunda después con un sistema vacutainer se realiza la punción y se toman 5 ml aproximadamente, después estas muestras se llevaron al laboratorio y por centrifugación se obtuvieron los sueros, estos posteriormente fueron trasladados a La FES-C C1 al laboratorio de Virología en la Unidad de Postgrado; (el traslado se llevó a cabo en contenedores herméticos a una temperatura de 4 °C.)

### **3.10.- Procedimiento del método Serológico: Aglutinación en placa.**

Para el método serológico de Aglutinación en placa que se utilizó se llevó a cabo:

- a) Primeramente, se dejó estabilizar el frasco que contenía el reactivo de aglutinación (antígeno de *Haemophilus parasuis* acondicionado) a temperatura ambiente (de 12°C a 25°C) aproximadamente por 15 minutos.
- b) En las celdas o pozos de las placas se deposita una gota de suero con la pipeta de muestra.
- c) En la misma celda donde se colocó la gota de suero a ser diagnosticado se procede a colocar una gota del reactivo de aglutinación.
- d) Se mezclan las dos gotas colocadas en la misma celda utilizando palillos mezcladores, con movimientos rotatorios hasta obtener una mezcla homogénea.
- e) Una vez realizada la mezcla se toma la placa de las esquinas con los dedos índice y pulgar de ambas manos y se agita la placa suavemente con movimientos ondulatorios por dos minutos esto se realiza a temperatura ambiente.
- f) Después de realizar la agitación se deja reposar la muestra por un minuto y posteriormente se toma la lectura, durante los 2 minutos posteriores.

#### **3.10.1.- Interpretación del método serológico.**

La interpretación de la lectura de las pruebas se realizó antes o al término de los 2 minutos. Y se califica como positiva o negativa, esto es si había aglutinación se tomaba como positivo y si no había aglutinación como negativo.

#### **3.10.2.- Principios del procedimiento.**

Para realizar la prueba y comprobar que un animal se encuentra infectado con *Haemophilus parasuis* se requiere de un reactivo que contenga antígeno de *Haemophilus parasuis*, ya que los antígenos son altamente específicos los animales que presenten la infección o colonización del *Haemophilus parasuis* darán positivo, y los que no darán negativo. Los resultados son sometidos a un método de interpretación cualitativo donde los animales infectados presentan la formación de aglutinación indicando así un resultado positivo; pero por otro lado en los animales sanos se observará una mezcla homogénea sin aglutinación indicando un resultado negativo.

## 4.- RESULTADOS

Se purifico y se identificó la existencia de la especie *Haemophilus parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), la confirmación fue realizada por pruebas Bioquímicas 1<sup>arias</sup> y 2<sup>arias</sup> las cuales fueron comparadas con las de referencias bibliográficas.

A continuación, se presenta una tabla con las principales características bioquímicas del *Haemophilus parasuis*, donde se observan los resultados obtenidos en el laboratorio de los aislamientos realizados y se comparan con los reportados en la bibliografía.

Prueba	Experimental	Bibliográfica
Gram	⊖	⊖
Morfología	Cocobacilar	Cocobacilar
Oxidasa	⊕	⊕
Catalasa	⊕	⊕
O/F	O/F	O/F
Ureasa	⊖	⊖
Reducción de nitratos	⊕	⊕
Hemólisis	⊖	⊖
Índole	⊖	⊖
Glucosa	⊕	⊕
Lactosa	⊖	⊖
Manitol	⊖	⊖
Dependencia al NAD	⊕	⊕
Mac Conkey	⊖	⊖
Citrato	⊖	⊖
MIO	⊖	⊖

Ya identificada la bacteria se prepararon matraces con medio de cultivo líquido (PPLO + NAD) hasta obtener el volumen necesario de Biomasa; llevándolo a incubación por 48 hrs, a 37 °C en baño María con agitación.

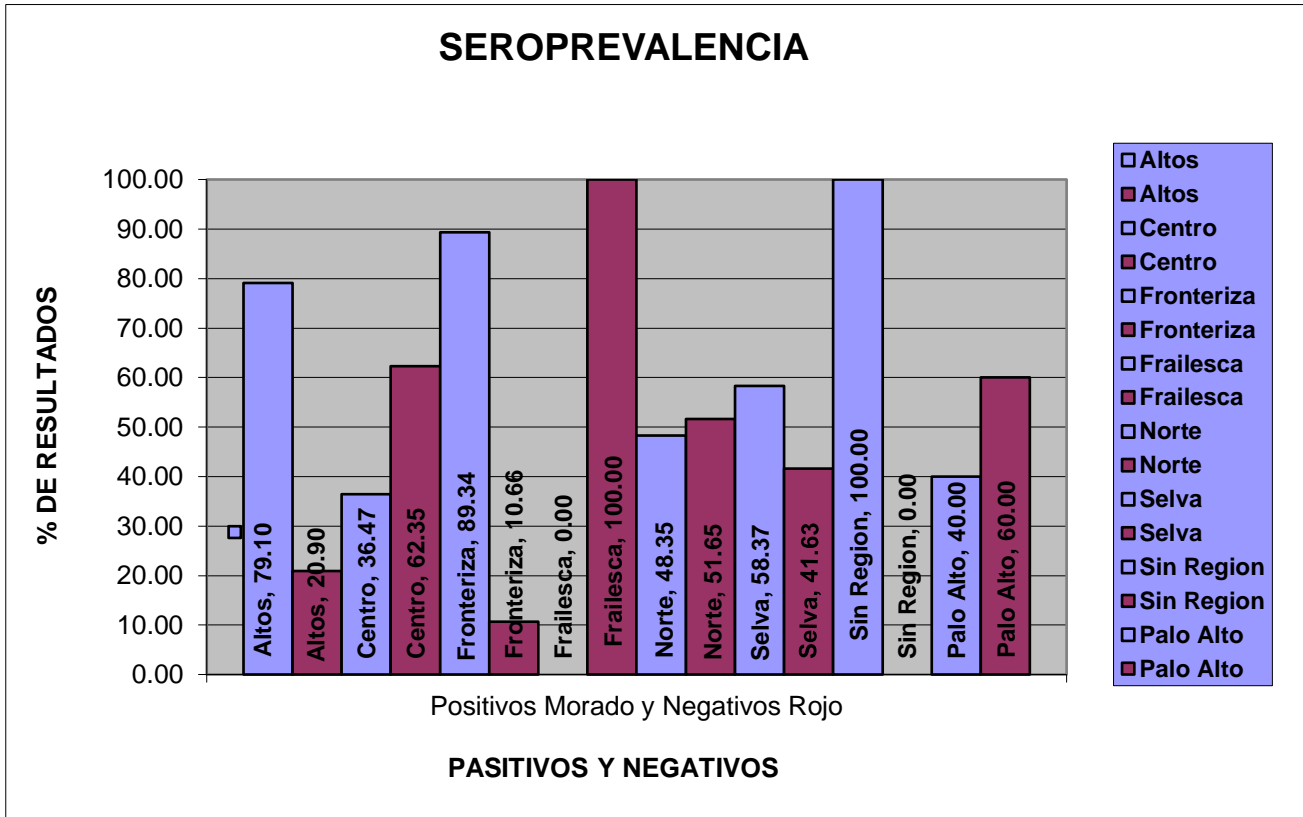
Se obtuvieron 6.24g, de biomasa la cual se tiño con colorante biológico (X) para realizar el acondicionamiento de la biomasa en la preparación del reactivo de aglutinación.

Para presentar los resultados obtenidos se realizó una tabla la cual se describe a continuación y se observa en el anexo 1:

Se hizo un muestreo en 714 sueros de cerdo, los cuales se ordenaron en orden ascendente, de los cuales 664 fueron de campo muestreados en Chiapas y 50 muestreados en el centro de investigación de Palo Alto, Cuajimalpa D.F., Del total de sueros 428 fueron Positivos. y 286 Negativos, se muestra la tabla en el anexo.

## 5.- ANALISIS DE RESULTADOS

Se hizo un muestreo en 714 sueros de los cuales 664 fueron de campo muestreados en Chiapas y 50 en el centro de investigación de Palo Alto, Cuajimalpa. D.F. Del total de sueros 428 fueron Positivos. y 286 Negativos. Evaluando estos resultados se obtuvo 59.94% positivos y 40.06% negativos. Se utilizaron como referencia sueros de cerdos vacunados con bacterina de *Haemophilus parasuis*, Control (+), suero de cerdos SPF (libres de patógenos específicos) como Control (-). Antes de ser vacunados con la bacterina y se hicieron titulaciones de anticuerpos (Suero inicial, Anticuerpos de *Haemophilus parasuis*, Nulos).





## 6.- DISCUSIÓN

La detección de anticuerpos en el suero de los animales enfermos no posee demasiado sentido. Por un lado, no permite diferenciar el serotipo implicado en la infección y por otro, el porcentaje previsto de animales portadores de los mismos ha de ser, necesariamente muy alto y su significación muy escasa, dado el carácter de comensal habitual en las fosas nasales de animales sanos.

A esto se le suman, además, que en muchas explotaciones circulan, sin demasiadas consecuencias, cepas de *Haemophilus parasuis* de virulencia baja o nula, pero que sí inducen respuesta humoral detectable y que, por otra parte, algunas cepas de *Haemophilus parasuis* solo son débilmente inmunogénicas, lo que traduce dificultades para la detección de la respuesta e incluso tampoco permite disponer de reactivos de calidad para ello.

Las razones anteriores hacen que, una serología positiva sea absolutamente compatible con un animal sano, hecho que, por otra parte, es considerado conveniente desde el punto de vista del control, puesto que supone una cierta experiencia inmunológica que previene de procesos agudos que pueden causar desastres económicos en la explotación.

Todavía, a los inconvenientes anteriores hay que unir la falta de especificidad que traduce no solo las reacciones cruzadas entre serotipos, ya comentadas, sino también con otras especies, como es el caso de *A. pleuropneumoniae* y de otras especies de la familia. En la práctica, se han utilizado diversas opciones serológicas de diagnóstico, como la reacción de fijación del complemento, el ELISA o la inmunofluorescencia.

El ELISA indirecto es, en la actualidad, el procedimiento más utilizado, con un antígeno obtenido a partir de un serotipo virulento, con niveles aceptables de sensibilidad y especificidad, aunque también se presentan reacciones cruzadas entre serotipos.

El diagnóstico diferencial debe incluir las infecciones bacterianas septicémicas causadas por *Streptococcus suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Actinobacillus suis*, *Salmonella choleraesuis* var. *Kunzendorf*, y *Escherichia coli*. *Mycoplasma hyorhinis polyserositis* y la artritis en cerdos de 3-a 10-semanas-de edad producen lesiones similares a *Haemophilus parasuis*.

La importancia del *Haemophilus parasuis* en bronconeumonía se puede comprobar solamente después de la identificación de otros patógenos virales y bacterianos que se puedan implicar en el proceso multifactorial de la enfermedad.

## 7.- CONCLUSIONES.

- Se obtuvo el antígeno de *Haemophilus parasuis* a partir de una cepa serotipo 5 (Nagasaki), para ser valorado en el diagnóstico de la enfermedad de Glässer, en cerdos.
- Se probaron diferentes medios de cultivo observando el mejor rendimiento con PPLO + EL.
- El acondicionamiento de la biomasa con el colorante de Rosa de Bengala fue exitoso.
- La técnica de aglutinación en placa es un método satisfactorio como prueba serológica.
- Se obtuvieron resultados satisfactorios, para detectar anticuerpos contra *Haemophilus parasuis* con la prueba de aglutinación en placa.
- El antígeno de *Haemophilus parasuis* presenta buenas expectativas para el diagnóstico rápido de la enfermedad de Glässer en cerdos.
- Se sugiere que este estudio preliminar se continúe valorándose con otras pruebas y se demuestre su especificidad.

## 8.- BIBLIOGRAFIA

- ♣ Amano, H.; Shibata, M.; Kajio, N; and Morozumi, T. 1994. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovars 1, 4, and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase meted. J Vet Med Sci 56:639-644.
- ♣ Amass, S. Swine Respiratory Diseases: A Review. Y The Effect of Wean Age on Pathogen Removal Memorias del VII Día del Porcicultor 1998. Asociación de Médicos Veterinarios Zootecnistas Especialistas en Ciencias Porcícolas del Sur de Sonora, A.C., Navojoa, Sonora, México. 1998. Pp 6-20.
- ♣ Baehler, J.F.; Burgisser, H.; de Meuron, P. A.; and Nicolet, J. 1974. Infection a *Haemophilus parasuis* chez le porc. Schweiz Arch Tierheilkd 116:183-188.
- ♣ Bakos, K ; nilsson, A.; and Thal, E.1952. Untersuchungen über *Haemophilus suis*. Nord Vet-Med 4:241-255.
- ♣ Barigazzi, G.; Valenza, F.; Bollo, E.; Guarda, F.; Candotti, P.; A. Raffo; and Foni, E. 1994. Anatomohistopathological features related to *Haemophilus parasuis* infection in pigs. Proc Int Congr Vet Soc 13:235.
- ♣ Bertschinger, H. U., and Nicod, B. 1970. Untersuchungen über die Nasenflora bei Schweinen Vergleich zwischen SPF-Herden und schwedisch sanierten Herden. Schweiz Arch Tierheilkd 112:493-499.
- ♣ Biberstein, E. L., and White, D.C..1969. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. J Med Microbiol 2:75-78.
- ♣ Blackall, P. J.; Trott, D. J.; Rapp-Gabrielson, V.; and Hampson, D. J. 1997. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. Vet Microbiol 56:125-134.
- ♣ Bloch, I. J. M. 1985. Beitrag zur Epidemiologie, Serologie und Polyacrylamid-Gelelektrophorese von *Haemophilus parasuis*. Diss. Univ Bern.
- ♣ Clark, L. K.; Hill, M. A.; Kniffen, T. S.; Van Alstine, W.; Stevenson, G.; Meyer, K. B.; Wu, C. C.; Scheidt, A. b.; Knox, K.; and Albregts, S. 1994. An evaluation of the components of medicated early weaning. Swine Health and Production 2:5-11.
- ♣ Calsamiglia, M. Development and application of molecular diagnostic techniques for *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Haemophilus parasuis*. Ph.D. Thesis. University of Minnesota. 1999.
- ♣ Calsamiglia, M., Pjoan, C. and Trigo, A. Application of a nested polymerasa chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J. Vet. Diagn. Invest 11:246-251 (1999).
- ♣ Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., (CINVESTAV-I.P.N.), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco. C.P. 07360 México, Ciudad de México. Apartado postal 14-740, 07000. Teléfono:(+52 55) 5747-3903
- ♣ Ciprián A, Medina G, Fuentes M, et al. Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. Vet Mex 1988;19:205-210.
- ♣ Ciprián, A., Colmenares, G. Y Mendoza, S. La Enfermedad en México *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. Compendio sobre *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*. Editado por AMVEC, AC. Guadalajara, Jal, México. Pp. 29-42. (1990).

- ♣ Ciprián, C.A., Mendoza, E.S; <http://www.ergomix.com>
- ♣ Ciprián, C.A. Impacto del diagnóstico serológico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en las diferentes prácticas de destete. Memorias Enfermedades Infecciosas en el Cerdo de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en cerdos de los Altos de Jalisco. Enero de 1999. Pags. 28-45.
- ♣ Ciprián, C.A.; Mendoza, E.S., Cruz, S.T., Colmenares, V.G., Romero, R.A. Sistema rápido para el diagnóstico serológico de App- Hps -Pm -Mh denominado NEUMOTESTmr . (marca registrada unam). Memorias del VIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (ALVEC) y VII Congreso Organismo Iberoamericano de Porcicultura (OIP), Colima, México. 1999.
- ♣ Colmenares, V., Mendoza, S., Ayala, G., and Ciprián, A. A rapid field serological test for the diagnostic of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Proceedings 12 th. International Pig Veterinary Society, 1992. The Hague, The Netherlands. P, 223. (1992).
- ♣ Cooper, V.L.; Doster, A R.; Hesse, R. A.; and Harris, N. B. 1995. Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens. J Vet Diagn Invest 7:313-320.
- ♣ Craft J. The adaptive immune system. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman-Cecil Medicine*. 25th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2016:chap 46.
- ♣ Dee, S. A. The porcine respiratory disease complex: are subpopulations important. Swine Health. Prod.4: 147-149. (1996).
- ♣ DeLey,J.; Mannheim,W.; Muters,R; Piechulla,K.; Tytgat,R.; Segers,P.; Bisgaard,M.; Frederiksen,W.; Hinz,K.-H.; and Vanhouke, M. 1990. Inter-and intrafamilial similarities of rRNS cistrons of the *Pasteurellaceae*. Int J Sys Bacteriol 40: 126-137.
- ♣ Del Rio, WL, Gutiérrez, CB, Ferri, EFR. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. J. Clin. Microbiol. 2003;41(2):880-882.
- ♣ *Diseases of swine. 10th edition.* Alejandro Ramirez, Jeffrey J. Zimmerman, Kent J. Schwartz, and Locke A. Karriker. editorial: Wiley-Blackwell, USA, 2012. *Chapter 55 Glasser disease, Virginia Aragón, Joaquim Segalés and Simine Oliveira*
- ♣ Desrosiers, R.; Phaneuf, J. B.; and Broes, A. 1986. An outbreak of atypical Glasser's disease in Quebec. Proc Int Congr Pig Vet Soc 9:277.
- ♣ Dewhirst, F. E.; Paster, B.J.; Olsen, I.; and Fraser, G.J. 1992. Phylogeny of 54 representative strains of species in the family *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S r RNA sequences. J Bacteriol 174:2002-2013.
- ♣ Gaylan Josephson, DVM, Dip Path., Nonie Smart, DVM, Ph D., Jackie Gallant,Bsc., *Haemophilus parasuis.*, American association of Swine Practitioners, 1999, pag: 487-488.
- ♣ Gingold, E. *Biología Molecular.* Ed. Acribia, S.A. P. 22-39. (1990).
- ♣ Gois, M.; Barnes, H.J.; and Ross, R.F. 1983. Potentiation of turbinate atrophy in pigs by long-term nasal colonization with *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res 44:372-378.
- ♣ Gottschalk, M. Avances recientes en el diagnóstico, tipificación y control de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis*. Memorias del VII Día del Porcicultor 1998. Asociación de Médicos Veterinarios Zootecnistas Especialistas en Ciencias Porcícolas del Sur de Sonora, A.C., Navojoa, Sonora, México. 1998. Pp 86-98.

- ♣ Harris, D. L.; Ross, R. F.; and Switzer, W. P. 1969. Incidence of certain microorganisms in nasal cavities of swine in Iowa. *Am J Vet Res* 30:1621-1624.
- ♣ Higushi, et al., *Biotechnology* 11:1026-1030. (1993).
- ♣ Hjärre, A. 1958. Enzootic virus pneumonia and Glässer's disease of swine. *Adv Vet Sci* 4:235-263.
- ♣ Hjärre, A., and Wramby, G. 1943. Über die fibrinöse Serosa-Gelenkentzündung (Glässer) beim Schwein. *Z Infektioskr Parasitenkd Krankheit Hyg Haustiere* 60:37—64.
- ♣ Hoefling, D. C. 1991. Acute myositis associated with *Haemophilus parasuis* in primary SPF sows. *J Vet Diagn Invest* 3:354-355.
- ♣ Juárez I.M. (2002) obtención de un antígeno de *Pasteurella multocida* de tipo "A" de conejo. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, pp: 26-30.
- ♣ Kielstein, P 1985. Zur Glässerschen Krankheit und Chemotherapeutika-Empfindlichkeit ihres Erregers. *Mh Vet-Med* 40:801-809.
- ♣ Kielstein, P., and Leirer, R. 1990. Zur Glässerschen Krankheit des Schweines-Ätiologisch-epizootiologische Untersuchungen zum Erregerspektrum. *Mh Vet-Med* 45:577-582.
- ♣ Kielstein, P., and RaBbach, A. 1991. Serologische Typisierung und Nachweis immunogener Kreuzreaktionen von *Haemophilus parasuis* (Glässersche Krankheit). *Mh Vet-Med* 46:586-589.
- ♣ Kielstein, P., and Rapp-Gabrielson, V.J. 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* based on immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J Clin Microbiol* 30:862-865.
- ♣ Kielstein. 1991. Zur Glässerschen Krankheit des Schweines Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen serologischen Eigenschaften, Kapselausbildung und Virulenz von *Haemophilus parasuis*-Stämmen. *Mh Vet-Med* 46:137-142.
- ♣ Kilian, M. 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of new species. *J Gen Microbiol* 93:9-62.
- ♣ Kirkwood, RN, Rawluk, SA, Cegielski, AC, Otto, AJ. Effect of pig age and autogenous sow vaccination on nasal mucosal colonization of pigs by *Haemophilus parasuis*. *J. Swine Health Prod.* 2001;9(2):77-79.
- ♣ Kobayashi, H.; Morozumi, T.; Miyamoto, C.; Shimizu, M.; Yamada, S.; Ohashi, S.; Kubo, M.; Kimura, K.; Mitani, K.; Ito, N.; and Yamamota, K. 1996. Mycoplasma hyorhinis infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *J Vet Med Sci* 58:109-113.
- ♣ Kobisch, M., and Desmettre, P. 1980 Hemophilose du porc: Pouvoir pathogène experimental de deux souches d'*Haemophilus parasuis*. *Rec Méd Vét* 156:219-224.
- ♣ Kott, B. E. 1983. Chronological Studies of Respiratory Disease in Baby Pigs. M.S. thesis, Iowa State Univ, Ames.
- ♣ Lecce, J. G. 1960. Porcine polyserositis with arthritis: isolation of fastidious pleuropneumoniae-like organism and *Haemophilus influenzae suis*. *Ann NY Acad Sci* 79:670-676.

- ♣ Lichtensteiger, C., Steenberger, S., Lee, R., Polson and Vimr, E. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. J. Clin. Microbiol .1996, 3035-3039. 1996.
- ♣ Little, T. W. A. 1970. *Haemophilus* infection in pigs. Vet Rec 87:399-402.
- ♣ Madsen P. 1984. Atypical outbreaks of Glässer`s disease in Danish pig herds. Proc Int Congr Pig Vet Soc 8:107.
- ♣ Mathew, C. Biología Molecular. Ed. Acribia, S.A p108-113. 1990.
- ♣ Menard, J., and Moore, C. 1990. Epidemiology and management of Glasser`s disease in SPF herds. In Proc 21<sup>st</sup> Annu Meet Am Assoc Swine Pract, Denver, pp. 187-200.
- ♣ Mendez-Trigo, A. V., and Trigo, E. 1996. Viability of *Haemophilus parasuis* in tissues, exudates and pure culture swabs. Proc Int Congr Pig Vet Soc 14:314.
- ♣ Mendoza, S., Ayala, G., Torres, O., and Ciprián, A. Study of a farma affected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* using the serological test PLEUROTEST MR . Proceedings 12 th. International Pig Veterinary Society, 1992. The Hague, The Netherlands. P, 188. (1992).
- ♣ Mendoza, S., Ciprian, C.A; Tercer Ciclo Nacional, Enfermedades respiratorias del cerdo; UNAM; FES-Cuautitlan; 2001,pags. 85-96.
- ♣ Mendoza, S, Torremorel M., Pijoan C. Conference sustainable animal production health and environment: futures changes, Hissar, India, p153. 1999.
- ♣ Miniats, O. P.; Smart, N. L. and Merzger, K. 1986. Glasser`s disease in southwestern Ontario. I. A retrospective study. Proc Int Congr Pig Vet Soc 9:279.
- ♣ Miniats, O. P.; Smart, N. L. and Rosendal, S. 1991. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs. Can J Vet Res 55:37-41.
- ♣ Møller, K., and Kilian, M. 1990 Vfactor-dependent members of the family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract. J. Clin Microbiol 28:2711-2716.
- ♣ Moller, K.; Anderse, L. V.; Christensen, G.; and Kilian, M. 1993. Optimization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. Vet Microbiol 36:261-271.
- ♣ Møller, K.; Fussing, V.; Grimont, P. A. D.; Paster, B. J.; Dewhirst, F. E.; and Kilian, M. 1996. *Actinobacillus minor* sp. nov., *Actinobacillus porcinus* sp.nov., and *Actinobacillus indolicus* sp. nov., three new V factor-dependent species from the respiratory tract of pigs. Int J Syst Bacteriol 46:951-956.
- ♣ Morris, R.S., Davies, P.R., Lawton, D.E. (2002) Evolution of diseases in the world`s pig industry. Proc. 16th IPVS Congress, Ames, IA, USA, pp.1-10.
- ♣ Morokoshi, T.; Kobayashi, K.; Kamino, T.; Owaki, S.; Hayashi, S.; and Hirato s. 1990 Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan. Jpn J Vet Sci 52:667-669.
- ♣ Morozumi, T., and Nicolet, J. 1986a. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strain. J Clin Microbiol 23:138-142
- ♣ Morozumi, T., and Nicolet, J.1986b. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. J Clin Microbiol 23:1022-1025.

- ♣ Morozumi, T.; Paullina, U.; Braun, R.; and Nicolet, J. 1986. Deoxyribonucleic acid relatedness among strains of *Haemophilus parasuis* and other *Haemophilus* ssp. Of swine origin. *Int J System Bacteriol* 36:17-19.
- ♣ Narita, M.; Kawashima, K.; Matsuura, S.; Uchimura, A.; and Miura, Y. 1994. Pneumonia in pigs infected with pseudorabies virus and *Haemophilus parasuis* serovar 4. *J Comp Path* 110:329-339.
- ♣ Nicolet, J.; Morozumi, T.; and Bloch, I. 1986. Proposal for a serological classification of *Haemophilus parasuis*. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 9:260.
- ♣ Nielsen, R. 1993. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes. *Acta Vet Scand* 34:193-198.
- ♣ Nielsen, R., and Danielsen, V. 1975. An outbreak of Glässer's disease: Studies on etiology, serology and the effect of vaccination. *Nord Vet-Med* 27: 20-25.
- ♣ Oliveira, S. (2004). Improving rates of success in isolating *Haemophilus parasuis* from clinical samples. *Journal of Swine Health and Production* 12, 308-309.
- ♣ Oliveira, S, Batista, L, Torremorell, M, Pijoan, C. Experimental colonization of piglets and gilts with systemic strains of *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis* to prevent disease. *Can J Vet Res* 2002;65(3):161-167.
- ♣ Oliveira, S., Blackall, PJ, Pijoan, C. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by serotyping and genotyping. *Am J Vet Res* 2003;64(4):435-442.
- ♣ Oliveira, S, Pijoan, C., Morrison, R. Comparison of *Haemophilus parasuis* control in the nursery using vaccination and controlled exposure. *Journal of Swine Health and Production*. (Accepted). 2004.
- ♣ Oliveira, S, Pijoan, C, Morrison, R. Role of *Haemophilus parasuis* in nursery mortality. *Proceedings of the Allen D. Leman Swine Conference, Minneapolis USA, 2002.* p. 111.
- ♣ Oliveira, S, Ruiz, A, Pijoan, C. Phenotypic and genotypic characterization of *Haemophilus parasuis* isolates involved in a multi-farm outbreak. *Proceedings of the 16th Congress of the International Pig Veterinary Society, Melbourne; 2000.* p.530.
- ♣ Oliveira, S, Galina, L, Pijoan, C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J Vet Diag Invest* 2001;(6):13:495-501.
- ♣ Oliveira, S, Mahlberg, J, Simonson, R. Safety of controlled exposure to *Haemophilus parasuis*: The role of sow vaccination and PRRSV infection. Submitted for oral presentation at the 18th Congress of the International Pig Veterinary Society, Hamburg. 2004.
- ♣ Oliveira, S, Pijoan, C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Review article. *Vet. Microbiol.* 2004;99(1):1-12.
- ♣ Orozco, V.; Flores, V.; [www.lapisa.com/glasser.html](http://www.lapisa.com/glasser.html)
- ♣ Peet, R. L.; Fry, J.; Lloyd, J.; Henderson, J.; Curran, J.; and Moir, D. 1983. *Haemophilus parasuis* septicaemia in pigs. *Aust Vet J* 60:187.
- ♣ Pijoan, C., Torremorell, M., Solano, G. (1997) Colonization patterns by the bacterial flora of young pigs. *Proc. 28th Annual Meeting AASP, Quebec City, Canada,* pp.463-464.

- ♣ Pöhle, D.; Johannsen, U.; Kielstein, P.; RaBbach, A.; and Wiegand, M. 1992. Investigations on pathology and pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection of swine. Proc Int Congr Pig Vet Soc 12: 335.
- ♣ Rafiee, M, Bara, M, Stephens, CP, Blackall, PJ. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. Aust. Vet. J. 2000;78(12):846-849.
- ♣ Rapp, V. J.; Ross, R F.; and Nicolet, J. 1986. Characterization of thr outer membrane protein of *Haemophilus parasuis*. Proc Int Congr Pig Vet Soc 9:262.
- ♣ Rapp-Gabrielson, V. J., and Gabrielson, D.A. 1992. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am J Vet Res 53:659-664.
- ♣ Rapp-Gabrielson, V. J.; Gabrielson, D.A.; and Musser, J. M. 1992a. Phenotypic and genotypic diversity of *Haemophilus parasuis*. Proc Int Congr Pig Ver Soc 12:334.
- ♣ Rapp-Gabrielson, V.J. 1993. *Haemophilus parasuis*: The association of serovar with prevalence, pathogenicity, and immunogenicity. Proc Allen D Lemam Swine Conf, St. Paul, 20:31-33
- ♣ Rapp-Gabrielson, V.J. Kocur, G. J.; Clark, J. T.; and Muir, S. K. 1997. *Haemophilus parasuis*: Immunity un swine following vaccination. Vet Med 92:83-90.
- ♣ Rapp-Gabrielson, V.J. Kocur, G.; Clark, J.; Muir, S.; and White, R. 1996. Efficacy and duration of immunity of the *Haemophilus parasuis* fractions of Suvaxyn® RespiFend® MH/HPS. Proc Int Congr Pig Vet Soc 14:300.
- ♣ Rapp-Gabrielson, V.J.; Gabrielson, D.A.; and Schamber, G. J. 1992b. Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. Am J Vet Res 53:987-994.
- ♣ Rapp-Gabrielson, V.J.; Kocur, G. J.; Clark, J. T.; and Muir, S. K. 1995. Virulence of different serovars of *Haemophilus parasuis* for cesarean-derived, colostrum-deprived pigs. In *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*. Ed. W. Donachie, F. A. Lainson, and J. C. Hodgson. New York: Plenum Press, p.204.
- ♣ Riising, H. J. 1981. Prevention of Glässer`s Disease through immunity to *Haemophilus parasuis*. Zentralbl Veterinarmed (B) 28:630-638.
- ♣ Riley, M. G. I.; Russell, E. G.; and Callinan, R. B. 1997. *Haemophilus parasuis* infection in swine. J Am Vet Med Assoc 171:649-651.
- ♣ Rodrigez Ferri, EF., Barceló, J., Sanchez-Viscaíno, J.M., Enfermedade de Glässer, 2002. <http://www.sanidadanimal.info/curso/3/nombre.htm>
- ♣ Rodríguez Ferri, EF., Gutiérrez, C.B., de la Puente, V., García del Blanco, N., Navas, J., Paniagua, C., del Río, M.L., Monter, J.L. y J.N: García de la Fuente. 2000. Meningitis bacterianas en el cerdo. Enfermedad de Glässer. Porci, 59: 43-60
- ♣ Rosner, H.; Kielstein, P.; Müller, W.; and Rohrmann, B. 1991. Beziehung zwischen Serotyp, Virulenz und SDS-PAGE Proteinmustern von *Haemophilus parasuis*. Dtsch Tierärztl Wschr 98:327-330.
- ♣ Schimmel, D.; Hogg, A.; and Uhlemann, J. 1992. Prevention of *Haemophilus parasuis* infection with an inactivated vaccine. Proc Int Congr Pig Vet Soc 12:336.
- ♣ Schimmel, D.; Kielstein, P.; and Hass, R. 1985. Zur serologische Typisierung von *Haemophilus parasuis*. Arch Exp Vet Med, Leipzig, 39:944-947.



- ♣ Smart, N.L.; Miniats, O.P.; Rosendal, S.; and Friendship, R. 1989. Glasser's disease and prevalence of subclinical infection with *Haemophilus parasuis* in swine in southern Ontario. Can Vet J 30:339-343.
- ♣ Smart, N.L.; Miniats, O.P.; and Macinnes, J.I. 1998. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolated from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting Can J Vet Res 52:319-324.
- ♣ Solano, G.I., Bautista, E., Molitor, T.W., Segales, J.M., Pijoan, C. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the clearance of *Haemophilus parasuis* by porcine alveolar macrophages. Can J Vet Res 1998;62:251-256.
- ♣ Solano, G.; Pijoan, C.; Rapp-Gabrielson, V.; Collins, J.; Carvalho, L.F.; and Winkelman, N. 1998. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. Am J Vet Res. In press.
- ♣ Trigo, E.; Mendez-Trigo, A. V.; and Simonson, R. 1996. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis*: A retrospective study from clinical cases submitted during 1994 and 1995 to veterinary diagnostic laboratory. Proc Int Congr Pig Vet Soc 14:313.
- ♣ Torremorell, M. Ph.D. Thesis. University of Minnesota. 1999.
- ♣ Torres, M.E., Mendoza, E.S., Tórtora, P.J., Correa, G.P., Lara, H.J.P., Flores, L., García, R. Y Ciprián, C.A. Efecto del Paramyxovirus porcino en la presentación de la pleuropneumonia contagiosa porcina producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. Memorias del XXXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. (AMVEC). Veracruz, Ver. 1996. Pag. 65.
- ♣ Vahle, J. I. 1996. Pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection in swine. Ph.D.diss., Iowa State Univ, Ames.
- ♣ Vahle, J.L.; Harness, J.S.; and Andrews, J. J. 1995. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: Clinical, bacteriological, and morphologic findings. J Vet Diagn Invest 7:476-480.
- ♣ Vahle, J.L.; Haynes, J.S.; and Andrews, J.J. 1997. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrums deprived (CDCD) swine. Can J Vet Res 61:200-206.
- ♣ Valdivia, G., González, S.C., Fraire, C.M., Peña, G., Nuñez, O.L., Campomanes, A., Cortés, C.G. y Delgadillo, A.J. Propuesta de un Sistema Nacional de Diagnóstico en Salud Animal. Memoria de la sexta Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. 1997. 265-277.
- ♣ Wiseman, B.; Harris, D. L.; Glock, R. D.; and Wilkins, L. 1989. Management of seedstock that is negative for *Haemophilus parasuis*. In Proc 20<sup>th</sup> Annu Meet Am Assoc Swine Oract, Des Moines, pp.23-25.
- ♣ Whittemore T. C., Producción del Cerdo., De. AEDOS, 1a. Edición, España, 1988.
- ♣ Zeman, D.H. The best diagnostic test. Swine Health and Production (4):159-160. 1997
- ♣ Zucker, B. A.; Baghian, A.; Truax, R.; O'Reilly, K. L.; and Storz, J. 1996. Detection of strain-specific antigenic epitopes of the lipo-oligosaccharide of *Haemophilus parasuis* by use of monoclonal and polyclonal antibodies. Am J Vet Res 57:63-67.
- ♣ Zucker, B.; Krüger, M.; Rehak, E.; and Horsch, F. 1994. Untersuchungen zur Lipopolysaccharidstruktur von *Haemophilus parasuis*-Stämmen in der SDS-PAGE. Berl Münch Tierärztl Wschr 107:78-81.

## 9.- ABREVIATURAS

- AGPT:** Prueba de precipitación en agar-gel.
- CA:** Conversión alimenticia.
- CDCD:** Animales nacidos por cesárea y privados de calostro.
- DNT:** Toxina dermonecrótica.
- EG:** Enfermedad de Glässer.
- GDP:** Ganancia diaria de peso.
- LPS:** Lipopolisacaridos.
- MEW:** Destete precoz medicado.
- NAD:** Nicotinamida adenina dinucleótido.
- NE:** Neumonía enzoótica.
- PAGE:** Patrones agar-gel electroforéticos.
- PCP:** Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.
- PCR:** Reacción en cadena de polimerasa.
- PCR-RFLP:** El polimorfismo de largo de fragmento de restricción.
- PP:** Pasteurelisis pulmonar.
- PRDC:** Complejo de la enfermedad respiratoria porcina.
- PRRS:** El síndrome reproductivo y respiratorio porcino.
- SDS-PAGE:** Gel de electroforesis de dodecyl sulfato de sodio-polyacrylamida.
- SEW:** Destete precoz separado.
- SPF:** Libres de patógenos específicos.
- Taqman:** Sondas de hidrolisis.

## 10.- GLOSARIO

**ADN:** Acido Desoxirribonucleico. El Ácido Desoxirribonucleico es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.

**Agente Etiológico:** Es aquel agente (virus, bacteria, sustancia...) que desencadena la aparición de una enfermedad.

**AGPT:** Prueba de precipitación en agar-gel por sus siglas en inglés, (Agar Gel Precipitation Test).

**Aislamiento:** Técnicas usadas en el laboratorio de microbiología para la transferencia de un microorganismo de un ambiente a otro con la finalidad de inducir su crecimiento para su identificación.

**Anticuerpo:** Es una proteína producida por el sistema inmunitario del cuerpo cuando detecta sustancias dañinas, llamadas antígenos. Los ejemplos de antígenos abarcan microorganismos (tales como bacterias, hongos, parásitos y virus) y químicos.

**Anticuerpos monoclonales:** Anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral. Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos idénticos porque son producidos por un solo tipo de célula del sistema inmune, es decir, todos los clones proceden de una sola célula madre.

**Policlonales:** Son anticuerpos derivados de diferentes líneas de células B, los linfocitos encargados de la respuesta ante elementos ajenos (antígenos) mediante anticuerpos. Los anticuerpos policlonales son una mezcla de inmunoglobulinas, secretados en contra de un antígeno específico, cada una reconociendo diferentes epítomos.

**Antígeno:** Es cualquier sustancia que provoca que el sistema inmune produzca anticuerpos contra sí mismo. Esto significa que su sistema inmunitario no reconoce la sustancia, y está tratando de combatirla.

**Antibiótico:** Medicamentos potentes que combaten las infecciones bacterianas.

**Articulación:** Es la zona donde 2 huesos se encuentran. Existen más de 100 tipos diferentes de artritis.

**Artritis:** Es la inflamación de una o más articulaciones.

**Bacteria:** Microorganismos perteneciente al grupo monera. Son unicelulares, procariontes y carecen en general de pigmentos asimiladores; se reproducen por bipartición. Poseen un solo cromosoma disperso por el protoplasma (carente de membrana nuclear); en algunos casos, existe un pequeño fragmento adicional denominado plásmido.

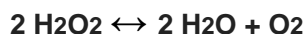
**Bacteria gramnegativa:** En microbiología, se denominan bacterias gramnegativas aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre de "gramnegativas" o también "Gram-negativas".

**Bacteria grampositiva:** En microbiología, se denominan bacterias grampositivas, o bacterias Gram-positivas, aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram.

**Biomasa:** Materia total de los seres que viven en un lugar determinado, expresada en peso por unidad de área o de volumen.

**Caldo PPLO:** Medio de cultivo, no selectivo, adecuado para el cultivo de microorganismos.

**Catalasa:** Enzima perteneciente a la categoría de las oxidorreductasas que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en oxígeno y agua. Esta enzima utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso.



El peróxido de hidrógeno es un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos y tiene, entre otras, una función protectora contra microorganismos patógenos, principalmente anaerobios, pero dada su toxicidad debe transformarse rápidamente en compuestos menos peligrosos.

**Cepa:** Conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

**Cepario:** Entidad en donde se realizan una serie de actividades cuyo objetivo fundamental es el obtener, preservar, clasificar, estudiar y documentar de manera completa y accesible, un acervo de cultivos de microorganismos auténticamente puros, estables y bien clasificados de interés específico, los cuales generan toda una serie de información especializada de relevancia en diferentes ámbitos como la salud, medicina, industria, agricultura, biotecnología, investigación y docencia.

**CINVESTAV:** Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

**Colonización:** Entrada y persistencia de bacterias sin causar enfermedad en el hospedero.

**Cromosoma:** Son estructuras que se encuentran en el centro (núcleo) de las células que transportan fragmentos largos de ADN. El ADN es el material que contiene los genes y es el pilar fundamental del cuerpo humano.

**Cromosómico:** Perteneciente o relativo a los cromosomas.

**ELISA:** La técnica ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: 'ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas') es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costes del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.

**Enfermedad de Glässer:** Enfermedad causada por una bacteria septicémica (*Haemophilus parasuis*) que causa una *poliserositis* y *artritis* esporádica especialmente en lechones y cerdos de cebo.

**Enzima:** Proteína que cataliza las reacciones bioquímicas del metabolismo.

**Epizootiología:** Ciencia que estudia la presentación y evolución del estado de salud y de enfermedad, así como su distribución y evolución en las poblaciones de animales.

**Epítopo:** Se denomina epítopo o determinante antigénico a la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia específica a la que se unen los anticuerpos.

**Erradicación:** Es la reducción a cero de la incidencia de una enfermedad con mantenimiento indefinido en el tiempo de las medidas de control, mientras no se erradique el agente.

**Agente Etiológico:** Se trata del elemento que propicia el desarrollo de una enfermedad. Las bacterias y los virus están entre los agentes etiológicos más comunes.

**Evaginación:** Protuberancia o saliente hueco de un conducto orgánico de una parte o de un órgano a través de la cubierta que lo rodea.

**Factor V (NAD):** Medio de enriquecimiento para caldo de cultivo, Nicotinamida Adenina Dinucleótido.

**Fenotipos:** Es la suma de rasgos observables en un organismo, rasgos que nos hacen identificarlo como perteneciente a una determinada especie.

**Flora Bacteriana:** Conjunto de microorganismos que conviven en nuestro organismo sin causarnos enfermedad. La flora bacteriana generalmente se asocia a aquella ubicada en el tracto gastrointestinal, pero en realidad también habita otros órganos y sistemas, como la piel, las vías respiratorias, la vagina y el oído.

**Flora Saprofita:** Grupo de microorganismos que viven en el cuerpo de forma natural, como la flora intestinal.

**Fimbrias:** Conjunto de filamentos o apéndices filiformes cortos que rodean algunas bacterias gram-negativas. Es un apéndice proteínico, presente en muchas bacterias, más delgado y corto que un flagelo. Estos apéndices oscilan entre 4 - 7 nm de diámetro y hasta varios  $\mu\text{m}$  de largo y corresponden a evaginaciones de la membrana citoplasmática que asoman al exterior a través de los poros de la pared celular.

**Genotipo:** Es el conjunto de genes que contiene un organismo heredado de sus progenitores. En organismos diploides, la mitad de los genes se heredan del padre y la otra mitad de la madre.

**Hábitat:** Lugar que presenta las condiciones apropiadas para que viva un organismo, especie o comunidad animal o vegetal.

**Inoculación:** Introducción de microorganismos vivos, muertos o atenuados, en un organismo de forma accidental o voluntaria.

**Inmunidad:** Es la resistencia que tiene o adquiere un organismo para enfrentar enfermedades y quedar libre de ellas. Viene de la palabra inmune, que quiere decir libre, exento de algo.

**Medicamento:** a toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o de rehabilitación, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas.

**Morbilidad:** Relación entre el número de afectados de una enfermedad determinada y la población total de una zona.

**Mortalidad:** Relación entre el número de muertos por todas las causas y la población total de una zona.

**Oxidada:** Enzima que cataliza una reacción de oxidación/reducción empleando oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) como aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua (H<sub>2</sub>O) o a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Las oxidasas son una subclase de las oxidorreductasas.

**PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida por sus siglas en inglés. (polyacrylamide gel electrophoresis).

**Patógeno:** Todo agente externo que se aloja en un ente biológico determinado, dañando de alguna manera su anatomía a partir de enfermedades o daños visibles o no.

**Patogenicidad:** Capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible.

**PCR:** La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1983 por Kary Mullis. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad.

**PCR-RFLP:** Siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism. Técnica que radica en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR. Si dos amplicones presentan una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos. (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism).

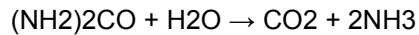
**Plásmido:** Molécula de ADN extra cromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. Su tamaño varía desde 1 a 250 kb.

**Poliserositis:** Inflamación simultánea de varias membranas serosas (pleura, peritoneo, pericardio, etcétera).

**Serotipo:** Categoría en la que se clasifican los microbios o los virus según su reacción en presencia de suero que contiene anticuerpos específicos.

**SPF:** Cerdos libres de patógenos, por sus siglas en inglés (Swin Pathogen Free).

**Ureasa:** Enzima que cataliza la hidrólisis de urea a dióxido de carbono y amoníaco. La reacción ocurre de la siguiente manera:



Específicamente, la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea para producir amoníaco y carbamato, el carbamato producido es subsecuentemente degradado por medio de una hidrólisis espontánea para producir otra molécula de amoníaco y ácido carbónico. La actividad de la ureasa tiende a incrementar el pH del medio en el que se encuentra debido a la producción de amoníaco. Es producida por bacteria, hongos y varias plantas superiores. La ureasa, funcionalmente, pertenece a la super familia de las amidohidrolasas y fosfotriesterasas.

**Vacuna:** Preparación biológica que contienen un microorganismo, parte de él o un producto derivado de él, y que se administran a una persona con el objeto de inducir una respuesta inmunitaria mediante la producción de anticuerpos, específica para prevenir o controlar estados patológicos. De forma protectora similar a la de la infección natural, pero sin peligro para el vacunado.

**Vacunación:** A la aplicación de un producto inmunizante a un organismo con objeto de protegerlo contra el riesgo de una enfermedad determinada, esta acción no necesariamente produce inmunización, ya que la respuesta inmune varía de un individuo a otro.

**Virulencia:** Grado de patogenicidad que posee un microorganismo en función de la gravedad de las lesiones que provoca y de la capacidad que posee para invadir nuevos tejidos.

Anexo Número 1

Región		02 Altos		Municipio			Santiago del pinar			Fecha 23/04/2003				SEROLOGIA
Nº de Suero	Edad Meses	Raza	Sexo	Características del Semoviente			Propietario	Nº de cerdos del predio	Domicilio	Localidad			H. Parasuis	
Nº1	#1	8	Criollo	M	Arete Nº 37			Andres Sánchez Gómez	5	Conocido	Cab. Mpal.			—
Nº2	#2	8	Criollo	M	Arete Nº 38									+
Nº3	#3	20	Criollo	H	Arete Nº 39									+
Nº4	#4	16	Criollo	M	Arete Nº 40									+
Nº5	#5	24	Criollo	H	Arete Nº 41									+
Región		02 Altos		Municipio			Sn. A. Larainza			Fecha 24/04/03				SEROLOGIA
Nº de Suero	Edad Meses	Raza	Sexo	Características del Semoviente			Propietario	Nº de cerdos del predio	Domicilio	Localidad			H. Parasuis	
Nº6	#1	26	Criollo	M	Arete Nº 42			Antonio Hernández Hdz.	5	Conocido	Cab. Mpal.			+
Nº7	#2	20	Criollo	M	Arete Nº 43									+
Nº8	#3	12	Criollo	M	Arete Nº 44									+
Nº9	#4	14	Criollo	M	Arete Nº 45									+
Nº10	#5	20	Criollo	M	Arete Nº 46									+
Región		02 Altos		Municipio			Oxchuc			Fecha 21/04/03				SEROLOGIA
Nº de Suero	Edad Meses	Raza	Sexo	Características del Semoviente			Propietario	Nº de cerdos del predio	Domicilio	Localidad			H. Parasuis	
Nº11	#1	16	Criollo	H	Arete Nº 7			Tito Santiz Gómez	6	Conocido	B. Sto. Tomas			+
Nº12	#2	20	Criollo	H	Arete Nº 8									+
Nº13	#3	24	Criollo	M	Arete Nº 9									+
Nº14	#4	6	Criollo	M	Arete Nº 10									+
Nº15	#5	8	Criollo	H	Arete Nº 11									+
Región		02 Altos		Municipio			Altamirano			Fecha 21/04/03				SEROLOGIA
Nº de Suero	Edad Meses	Raza	Sexo	Características del Semoviente			Propietario	Nº de cerdos del predio	Domicilio	Localidad			H. Parasuis	
Nº16	#1	6	Criollo	H	Arete Nº 1			Juliana Santiz López	3	Conocido	Cab. Mpal.			—
Nº17	#2	6	Criollo	M	Arete Nº 2									—
Nº18	#3	6	Criollo	M	Arete Nº 3									—
Nº19	#4	8	Criollo	H	Arete Nº 4			Oscar López Méndez	19					+
Nº20	#5	8	Criollo	H	Arete Nº 5									+
Nº21	#6	8	Criollo	M	Arete Nº 6									+
Región		02 Altos		Municipio			Huixtan			Fecha 22/04/03				SEROLOGIA
Nº de Suero	Edad Meses	Raza	Sexo	Características del Semoviente			Propietario	Nº de cerdos del predio	Domicilio	Localidad			H. Parasuis	
Nº22	#1	36	Criollo	M	Arete Nº 22			Nicolás Ton Vázquez	5	Conocido	Ejido. Yalcuc			+
Nº23	#2	5	Criollo	H	Arete Nº 23									+
Nº24	#3	8	Criollo	H	Arete Nº 24									+
Nº25	#4	10	Criollo	H	Arete Nº 25									+
Nº26	#5	6	Criollo	M	Arete Nº 26									+
Nº27	#6	6	Criollo	M	Arete Nº 27			Miguel Cruz Santis	5					+
Nº28	#7	8	Criollo	H	Arete Nº 28									+
Nº29	#8	10	Criollo	M	Arete Nº 29									+
Nº30	#9	14	Criollo	M	Arete Nº 30									+
Nº31	#10	18	Criollo	M	Arete Nº 31									+
Región		02 Altos		Municipio			Chanal			Fecha 22/04/03				SEROLOGIA
Nº de Suero	Edad Meses	Raza	Sexo	Características del Semoviente			Propietario	Nº de cerdos del predio	Domicilio	Localidad			H. Parasuis	
Nº32	#1	8	Criollo	M	Arete Nº 12			Felipe Gómez López	3	Conocido	Barro Bajo			+
Nº33	#2	12	Criollo	H	Arete Nº 13									+
Nº34	#3	6	Criollo	H	Arete Nº 14									+
Nº35	#4	12	Criollo	H	Arete Nº 15			Miguel López Etzin	1					+
Nº36	#5	16	Criollo	H	Arete Nº 16			Antonio Méndez Gómez	6					+
Nº37	#6	16	Criollo	H	Arete Nº 17									+
Nº38	#7	24	Criollo	H	Arete Nº 18									+
Nº39	#8	4	Criollo	M	Arete Nº 19									+
Nº40	#9	22	Criollo	H	Arete Nº 20									+
Nº41	#10	4	Criollo	H	Arete Nº 21									+