



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Evaluación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

ANA CECILIA FALCÓN MISSETT

MIRIAM MORALES ISLAS

SARAÍ SALAZAR ROSALIO

ASESOR:

Dra. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

Q.F.B. NYDIA BERENICE GONZÁLEZ ÁNGELES

Dr. ABEL CIPRIAN CARRASCO

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR

Que presenta la pasante: **Ana Cecilia Falcón Missett**

Con número de cuenta: **309089261** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez</u>	
1er. SUPLENTE	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	

NOTA: los sinodales suplentes estén obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautilán.

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**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR

Que presenta la pasante: **Ana Cecilia Falcón Missett**

Con número de cuenta: **309089261** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautilán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	_____
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	<i>Ana Laura Vázquez Martínez</i>
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	_____
1er. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	_____
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	_____

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

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.F.A.B.T.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR

Que presenta la pasante: **Ana Cecilia Falcón Misset**

Con número de cuenta: **309089261** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
1er. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

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

LMCF/javg



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR

Que presenta la pasante: **Ana Cecilia Falcón Missett**
Con número de cuenta: **309089261** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	_____
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	_____
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	_____
1er. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	_____

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

LMCF/javg



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**


Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR

Que presenta la pasante: **Ana Cecilia Falcón Missett**
Con número de cuenta: **309089261** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>	_____
VOCAL	<u>M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	_____
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	

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

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

F.F.C.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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 la: **Tesis**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR

Que presenta la pasante: **Miriam Morales Islas**

Con número de cuenta: **308131996** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

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

LMCF/AVE



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

IZCALLI, MEX.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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 la: **Tesis**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR

Que presenta la pasante: **Miriam Morales Islas**

Con número de cuenta: **308131996** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	<u><i>Ana Laura Vázquez Martínez</i></u>
SECRETARIO	<u>QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez</u>	
1er. SUPLENTE	<u>LBD. Larisa Andrea González Salcedo</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	

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

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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 la: **Tesis**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR

Que presenta la pasante: **Miriam Morales Islas**

Con número de cuenta: **308131996** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

NOTA: los suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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 la: **Tesis**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR

Que presenta la pasante: **Miriam Morales Islas**

Con número de cuenta: **308131996** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	_____
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	_____
SECRETARIO	QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez	_____
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	_____

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

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

F.E.S.C.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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 la: **Tesis**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR

Que presenta la pasante: **Miriam Morales Islas**

Con número de cuenta: **308131996** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

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

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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



ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR.

Que presenta la pasante: **Saraí Salazar Rosalío.**

Con número de cuenta: **309280468** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

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

LMCF/cor*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE ESTADOS UNIDOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR.

Que presenta la pasante: **Sara Salazar Rosalio.**

Con número de cuenta: **309280468** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	<i>Ana Laura Vázquez Martínez</i>
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

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

LMCF/cnn*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE ESTADOS UNIDOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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



ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR.

Que presenta la pasante: **Saraí Salazar Rosalío.**

Con número de cuenta: **309280468** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	_____
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	_____
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse al día y hora del Examen Profesional.

LMCF/can*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AFIRMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

F.F.S.S. de
CUALIFICACIÓN DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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



ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR.

Que presenta la pasante: **Sarai Salazar Rosalio.**

Con número de cuenta: **309280468** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	_____
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	_____
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	_____
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	_____

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

LMCF/cnn*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
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**

Evaluación de Actinobacillus pleuropneumoniae en muestras de pulmones neumónicos de cerdos por PCR.

Que presenta la pasante: **Sara Salazar Rosalio.**

Con número de cuenta: **309280468** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	_____
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	_____
SECRETARIO	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	_____
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	_____
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn*

AGRADECIMIENTOS

En memoria de tu luz, tu alegría, tu fuerza y tu amor. Por enseñarme a valorar y disfrutar de cada momento de la vida, por ser el pilar de esta familia y de mi vida. Gracias por confiar en mí y por estar siempre a mi lado en los días y noches más difíciles. Siempre has sido mi mejor guía de vida.

A ti que cuidas siempre de todos, que siempre estamos en tus oraciones y en tu corazón, que con tu sabiduría nos guías. Gracias por todo tu amor, apoyo y cuidados, por perseguirme todas las mañanas con la licuadora llenando mágicamente mi vaso, asegurándote de mi bienestar.

A ti que no solo nos une la genética, sino también el amor y el dolor, que nos confirma que estamos el uno para el otro. Gracias por tu amor, por ayudarme a madurar y por apoyarme a desglosar mis cuestiones existenciales.

Gracias a toda la familia Falcón por su amor y apoyo incondicional, por sus hermosos valores que me han inculcado, es una bendición ser parte de su familia.

Gracias a ti mi amor por ser mi cómplice, ser mis alas para soñar, los ánimos que me impulsan a continuar, apoyarme a crecer y acompañarme en mi dolor y sufrimiento, por siempre fomentar alegría, risas y momentos inolvidables que me liberan.

A ti que siempre me apoyaste con mis ilustraciones escolares, que convertiste mi Nemo en aguacate. Gracias por siempre hacerme sentir tu amor y confiar en mí.

Gracias a ustedes que a su manera demostraron el amor y compromiso hacía mi mami.

A mis pececitas, que la distancia y el tiempo no ha sido un impedimento para seguir juntas acompañándonos y queriéndonos en esta vida.

Gracias a mis amigas y compañeras de tesis, por acompañarme durante toda la universidad y compartir su amistad y tantas experiencias.

A nuestra asesora por el tiempo dedicado y los conocimientos brindados.

Con cariño, respeto y admiración.

Ana Cecilia

Dedicado a mi hermosa Dahlia.

Agradezco primero a mis papas Mari y Víctor, por siempre dejarme ser y nunca limitarme pese a las circunstancias, a mis hermanas Jael y Victoria, por ser parte de mi inspiración y mis estándares, y de igual forma a mis hermanos Mario y Miguel ya que siempre cuento con su apoyo. A ti Will por el simple hecho de habernos cruzado y conectar tan bien a lo largo de tantos años.

Gracias a nuestra tutora la Dra. Susana E. Mendoza Elvira por siempre brindarnos la confianza, el apoyo y material necesario para poder llevar a cabo este proyecto, así como darnos la libertad de llevar a cabo todas nuestras inquietudes. A nuestra coasesora la QFB. Nydia Berenice Gonzales Ángeles por resolvernos todas nuestras dudas y brindarnos nuevas alternativas para llevar cabo el trabajo.

A mis compañeras de Tesis Ana y Saraí por crear esta bonita mancuerna y siempre ayudarnos una a la otra, así como divertirnos tanto con esta experiencia.

A todos los maestros que me acompañaron a lo largo de la carrera, a mis compañeros de generación y sobre todo gracias a la UNAM y Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 por brindarme los mejores años de mi vida de estudiante.

Con cariño, admiración y respeto.

Miriam

Primeramente, quiero agradecer a Jehová Dios por permitirme la vida, darme salud y poder estar al lado de mis seres queridos durante estos años.

A mis padres Gerardo y Lidia, por sus esfuerzos, desvelos y su trabajo tan arduo e inmenso durante años para darnos a mis hermanos y a mí una vida digna, este trabajo va dedicado a ustedes. Un “gracias” nunca será suficiente para poder expresar cuánto agradezco su apoyo y amor que me han dado en todo este tiempo, aunque a veces sientan que he tardado mucho en este proceso quiero decirles que, si bien es cierto que tropecé algunas veces y los hice pasar malos momentos, he podido salir adelante pensando en lo mucho que me han dado y quiero devolverles un poco de todo eso y así lograr que se sientan orgullosos de mí.

A mi hermanas, Nancy, Irma, Judith y Yanet por brindarme su apoyo, cuidarme, darme consejos y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas, porque a pesar de los problemas siempre hemos estado unidos para superarlos. Gracias por todo lo que han hecho por mí, son un gran ejemplo.

A mis hermanos Arturo y Hugo por contribuir a mi felicidad cada vez que los veía, son momentos que siempre tendré presentes.

A mis compañeras y amigas Miriam y Ana, gracias por estar durante estos años conmigo, juntas pudimos salir adelante en nuestra carrera universitaria, además de poder realizar este trabajo que solo es un fruto de nuestro trabajo que realizamos durante mucho tiempo y sobre todo por no darnos por vencidas.

Este trabajo también va dedicado a una gran amiga y gran persona que, lamentablemente, ya no está presente, Pamela, ella siempre me alentó a seguir adelante y no darme por vencida, en poco tiempo se convirtió en alguien muy especial para mí, teníamos muchas metas juntas y nos faltó tiempo para cumplirlas, así que este logro también es de ella, en todo este proceso, siempre estuvo presente, en cada lugar de la Facultad, del laboratorio, ella estaba conmigo. Te extraño mucho.

A nuestra asesora, la Doctora Susy que siempre nos apoyó en este proceso, brindándonos los recursos necesarios y sobre todo por tenernos mucha paciencia y confianza, gracias por ser una excelente maestra y persona, nos ha dejado grandes enseñanzas.

A todos mis maestros que contribuyeron a mi desarrollo profesional, gracias por sus conocimientos, experiencias y momentos inolvidables, sin ustedes, no existiría ninguna profesión.

A la UNAM y la FESC por darme los mejores años de mi vida y permitirme ser parte de su comunidad.

Con admiración, respeto y cariño.

Saraí

ÍNDICE

1.-	LISTA DE ABREVIATURAS	24
2.-	INTRODUCCIÓN.	26
3.-	MARCO TEÓRICO.	27
3.1.-	Complejo Respiratorio Porcino.	27
3.2.-	Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP).	27
3.2.1.-	Epidemiología.	28
3.2.2.-	Patogenia.	30
3.2.3.-	Tratamiento.	32
3.2.4.-	Prevención y control.	35
3.3.-	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	35
3.3.1.-	Características generales.	35
3.3.2.-	Genoma.	37
3.3.3.-	Factores de virulencia.	38
3.3.4.-	Cápsula.	39
3.3.5.-	Lipopolisacárido (LPS).	40
3.3.6.-	Proteínas de membrana Externa (OMP).	41
3.3.7.-	Sistema de adquisición de hierro.	41
3.3.8.-	Exotoxinas.	42
3.3.9.-	Proteasas.	43
3.3.10	Fimbrias.	43
3.4.-	Identificación de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	44
3.4.1.-	Necropsia.	44
3.4.2.-	Toma de muestra.	44
3.4.3.-	Histología.	46
3.4.4.-	Pruebas diagnósticas para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	47
3.4.5.-	Aislamiento bacteriológico.	47
3.5.-	Caracterización de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	50
3.5.1.-	Técnicas inmunológicas para detectar antígenos.	51
3.5.1.1.-	Inmunohistoquímica (IHQ).	51
3.5.1.2.-	Inmunofluorescencia (IF).	52
3.5.1.3.-	Separación inmunomagnética (IMS).	53
3.5.2.-	Técnicas que detectan anticuerpos.	54
3.5.2.1.-	Coaglutinación.	54
3.5.2.2.-	Fijación del complemento	55
3.5.2.3.-	ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).	56
3.5.2.4.-	Precipitación en gel o inmunodifusión.	58
3.5.2.5.-	Hemaglutinación indirecta (HAI).	58
3.5.3.-	Técnicas de Biología Molecular	60
3.5.3.1.-	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).	60
3.5.3.2.-	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	61

4.-	OBJETIVO GENERAL.	63
4.1.-	Objetivos particulares.	63
5.-	HIPÓTESIS.	63
6.-	MATERIAL Y MÉTODOS.	64
7.-	METODOLOGÍA.	64
7.1.-	Obtención de Biomasa de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , Serotipos 1 y 5.	64
7.2.-	Obtención y almacenamiento de control positivo (<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , Serotipos 1 y 5).	65
7.3.-	Liofilización.	65
7.4.-	Extracción y purificación del DNA de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	66
7.4.1.-	De bacteria: Serotipos 1 y 5 obtenidos de Biomasa.	66
7.4.2.-	De bacteria: Macerados de pulmones y tonsilas.	66
7.4.3.-	De tejido: Liofilizado de macerado.	67
7.4.4.-	De tejido: Liofilizado de tejido.	68
7.5.-	Evaluación de la calidad del DNA	68
7.5.1.-	Lectura de la pureza del DNA utilizando el Espectrofotómetro para microplacas (EPOCH)	
7.5.2.-	Lectura de la Integridad del DNA mediante Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%	69
7.6.-	PCR de punto final.	69
7.7.-	Caracterización del producto de PCR por electroforesis horizontal	71
8.-	RESULTADOS.	72
9.-	ANÁLISIS DE RESULTADOS.	83
10.-	CONCLUSIÓN.	87
11.-	REFERENCIAS.	87

ÍNDICE DE IMÁGENES Y CUADROS

Imagen 1.-	Distribución de los serotipos más prevalentes a nivel mundial.	28
Imagen 2.-	Factores predisponentes que favorecen el desarrollo de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.	29
Imagen 3.-	Transmisión de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	29
Cuadro 1.-	Principales signos clínicos y lesiones de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina causada por <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	31
Imagen 4.-	Pleuronía hemorrágico-necrosante característica de un cuadro agudo por <i>App</i> .	32
Imagen 5.-	Adherencias pleurales típicas de un caso crónico por <i>App</i> .	32
Imagen 6.-	Principales signos clínicos de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina causada por <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	32
Imagen 7.-	Opciones de vacunación de lechones.	33
Cuadro 2.-	Sensibilidad de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> frente a antibióticos.	34
Imagen 8.-	Morfología de <i>App</i> con Microscopio Electrónico de transmisión.	36
Cuadro 3.-	Distribución geográfica de los distintos serotipos de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en distintos países.	37
Imagen 9.-	Representación gráfica del genoma circular del <i>A. pleuropneumoniae</i> .	38
Imagen 10.	Diagrama esquemático de los factores de virulencia ubicados en el entorno celular virtual de <i>App</i> .	39
Cuadro 4.-	Características de toxinas de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	43
Cuadro 5.-	Tipo de muestras respiratorias de cerdo para el diagnóstico de <i>App</i> ventajas e inconvenientes.	45
Imagen 11.-	Pulmón con hallazgos de pleuropneumonia porcina.	45
Imagen 12	Lavados broncoalveolares o raspados bronquiales.	46
Imagen 13.-	Cortes histológicos de pulmones de cerdos experimentalmente inoculados con <i>App</i> .	46
Imagen 14.-	Cultivo de <i>App</i> en medios sólidos.	48
Cuadro 6.-	Características bioquímicas del <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	49
Cuadro 7.-	Pruebas para el diagnóstico y caracterización de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	51
Imagen 15.-	Inmunohistoquímica por el método indirecto de Peroxidasa-Antiperoxidasa.	52
Imagen 16.-	Inmunofluorescencia Directa e Indirecta.	53
Imagen 17.-	Separación inmunomagnética.	53
Imagen 18.-	Coaglutinación.	54
Imagen 19.-	Fijación del Complemento.	55
Imagen 20.-	Inmunoensayo enzimático ELISA.	56
Imagen 21.-	Inmunodifusión.	58
Imagen 22.-	Hemaglutinación indirecta (HAI).	59
Imagen 23.-	Hibridación fluorescente in situ (FISH).	60
Imagen 24.-	Pasos fundamentales en la Técnica de PCR.	62
Cuadro 8.-	Secuencia de los primers utilizados en la PCR para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	70

Cuadro 9.-	Muestras procesadas mediante PCR sin lectura de pureza e integridad.	72
Cuadro 10.-	Muestras con lectura de pureza antes de la curva de serotipos.	72
Cuadro 11.-	Lectura del EPOCH correspondiente a los serotipos 1 y 5.	73
Cuadro 12.-	Límite de detección de DNA de App para el serotipo 1.	73
Cuadro 13.-	Límite de detección de DNA de App para el serotipo 5.	73
Cuadro 14.-	Muestras descartadas debido a que NO cumplen con la relación 260/280 o con la concentración de DNA esperada.	73
Cuadro 15.-	Muestras que si cumplen con la pureza esperada y se les realizó PCR debido a la buena cantidad de ng de DNA que presentan.	76
Cuadro 16.-	Muestras que no cumplen con la pureza y /o cantidad necesaria de DNA necesaria pero que se les realizó PCR.	76
Cuadro 17.-	Muestras que cumplen con los ng requeridos de DNA para la realización de PCR.	76
Cuadro 18.-	Muestras que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR.	77
Imagen 25.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las muestras procesadas mediante PCR sin lectura de pureza e integridad.	77
Imagen 26.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras con lectura de pureza antes de la curva de serotipos.	78
Imagen 27.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de la curva de límite de detección inferior de DNA del st.1 a diferentes cantidades (μL).	79
Imagen 28.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de la curva de límite de detección inferior de DNA del st.5 a diferentes cantidades (μL).	79
Imagen 29.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR.	80
Imagen 30.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras que no tenían una buena pureza, pero con una buena cantidad de DNA.	80
Imagen 31.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR.	81
Imagen 32.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras liofilizadas de órgano que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR.	81
Imagen 33.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras liofilizadas de órgano que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR.	82
Imagen 34.-	Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras liofilizadas de órgano que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR.	82

1.- LISTA DE ABREVIATURAS

ADV	(Aujeszky's Disease Virus) Virus de la Enfermedad de Aujeszky
Ac	(Antibody) Anticuerpo
Ag	(Antigen) Antígeno
App	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
BHI	(Brain Heart Infusion) Infusión Cerebro Corazón
CAMP	Christie Atkins Munch Petersen
CPS	(capsular polysaccharide) Polisacárido capsular
CRP	Complejo respiratorio porcino
DNA	(deoxyribonucleic acid) Ácido desoxirribonucleico
DIVA	(Differentiating infected from vaccinated animals) Diferenciar animales infectados de vacunados
dNTPs	(deoxynucleotide) Desoxinucleótidos trifosfato
ELISA	(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
Fab	(Fragment antigen-binding) Fragmento de unión al antígeno
Fc	Fragmento de región cristalizante
FISH	(Fluorescent In Situ Hybridization) Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
HAI	Hemaglutinación indirecta
IF	(Immunofluorescence) Inmunofluorescencia
IgA	(Imunoglobulin A) Inmunoglobulina A
IgG	(Imunoglobulin G) Inmunoglobulina G
IHQ	(Immunohistochemistry) Inmunohistoquímica
IMS	(Immunomagnetic Separation) Separación inmunomagnética
kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
KDO	Ácido 2-ceto-3-deoxioctanato
LPS	Lipopolisacárido de la pared celular
Mpb	Un millón de pb
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido su forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido su forma reducida
OMP	(Outer Membrane Proteins) Proteínas de membrana externa
pb	Pares de bases
PBS	(Phosphate buffered saline) Salino taponado con fosfato
PCP	Pleuroneumonía Contagiosa Porcina
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Reacción en cadena de la polimerasa
PCV2	Circovirus Porcino tipo II
PFGE	(Pulsed-field gel electrophoresis) Electroforesis en gel de campo pulsado
PMN	Polimorfonucleares

PPLO	(Pleuropneumonia like organisms) Organismos similares a los de la pleuroneumonía
PRRSV	(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) Virus causante del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo
RNA	(Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleico
SIV	(Swine influenza viruses) Virus de la Influenza porcina
spp	Especies bacterianas o fúngicas
st	Serotipo
TAE	(Tris-Acetate-EDTA) Tampón de Tris, acetato y EDTA
UV	Ultravioleta
RTX	(Repeats in toxin) Repetición en la toxina
mbar	Milibar
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
μL	Microlitro

2.- INTRODUCCIÓN.

Durante mucho tiempo, las enfermedades respiratorias en el cerdo han afectado económicamente a los productores ya que los utilizan para comercializarlos, de manera que se ha considerado una problemática de gran importancia y su diagnóstico oportuno es indispensable para evitar este padecimiento.

El cerdo se ha aprovechado tanto para el consumo humano como para fabricación de ciertos artículos de uso personal, sin embargo, está expuesto a diferentes tipos de enfermedades infecciosas, siendo la más común la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) que causa la enfermedad denominada Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP). Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en muchos países y causa pérdidas en la ganancia de peso, conversión alimenticia, incremento en el número de días que se requieren para que los cerdos alcancen el peso de mercado, aumento en la prevalencia de lesiones pulmonares, incremento en la mortalidad y pérdidas económicas (Williams, 2000).

Actinobacillus pleuropneumoniae se clasifica en 15 serotipos y dos biotipos. Las cepas del biotipo 1 precisan para su crecimiento el factor sanguíneo V (nicotinamida adenín dinucleótido) y no lo precisan las del biotipo 2 (Moreno, 2015).

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina puede ser aguda o crónica, dependiendo de diferentes factores como: inmunidad de la piara, vacunación, medicación y condiciones ambientales. La forma aguda de la enfermedad se caracteriza por hemorragia extensiva y deposición de fibrina en los pulmones. En animales infectados crónicamente, el organismo puede quedar secuestrado en lesiones necróticas pulmonares, y puede ser recuperado de tonsilas y de las vías respiratorias altas. Los signos clínicos, la historia de la piara y las lesiones macroscópicas son base para el diagnóstico; sin embargo, la identificación completa del microorganismo requiere el aislamiento bacteriano y serotipificación (Hernández, 2002).

Los métodos microbiológicos utilizados comúnmente en la detección de este patógeno son laboriosos y consumen mucho tiempo. Esta situación, aunada a la demanda por resultados inmediatos y a los avances tecnológicos, ha conducido al desarrollo de una amplia gama de métodos rápidos en las últimas décadas (Palomino, 2014). Por lo cual ahora contamos con las técnicas de identificación molecular microbianas, una de ellas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.- MARCO TEÓRICO.

3.1.- Complejo Respiratorio Porcino (CRP).

La industria porcina ha sido afectada considerablemente con pérdidas económicas, ocasionadas por las enfermedades respiratorias principalmente involucradas en el Complejo Respiratorio Porcino. Este complejo se presenta con mayor incidencia entre las 12 a 20 semanas de edad, pero recientemente también se han incluido en este complejo a cerdos de destete. Las pérdidas económicas se ven reflejadas en la deficiente ganancia de peso, mala conversión alimenticia, aumento en el número de días en que los cerdos llegan a sacrificio, excesivo gasto por medicamentos y altos decomisos en matadero. El CRP clínicamente se caracteriza por alteraciones respiratorias, retraso en el crecimiento, incremento del índice de conversión, anorexia, letargia, fiebre e incremento de la mortalidad en cerdos de transición y/o engorda (Espinoza, 2020).

En el CRP están involucrados una serie de factores que desencadenan el problema, éste puede ser causado entre agentes infecciosos virales y bacterianos que actúan en forma sinérgica, así como factores predisponentes como es el estado inmunitario, edad, genética, manejo, altos niveles de estrés, mezcla de animales de distintos orígenes, densidad, alimentación, entre otras más. Entre los factores medioambientales destacan las concentraciones de amoníaco, ventilación y volumen del aire, temperatura y condiciones de las instalaciones. Entre los agentes virales están: el virus causante del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo (PRRSV), el virus de la Influenza porcina (SIV), el virus de la Enfermedad de Aujeszky (ADV), y el Circovirus Porcino tipo II (PCV2). Mientras que entre los agentes bacterianos se encuentra: las causantes de enfermedad respiratoria el *Mycoplasma hyopneumoniae* constituye el microorganismo más frecuentemente asociado a neumonía crónica en los porcinos, seguido de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiséptica*, *Streptococcus suis* y *Haemophilus parasuis* (Espinoza, 2020).

3.2.- Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP).

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina es una de las enfermedades bacterianas más importantes y devastadora del complejo respiratorio porcino (CRP) de todas las edades, causada por el agente etiológico *Actinobacillus pleuropneumoniae*, microorganismo específico del cerdo, que provoca un cuadro de pleuroneumonía hemorrágico-necrotizante, produciendo alta mortalidad (20-80%) y morbilidad (100%), por consiguiente, grandes pérdidas económicas en la producción industrializada del cerdo a nivel mundial (Enríquez, 2013).

3.2.1.-Epidemiología.

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo que sobre todo afecta a los países de producción intensiva (Imagen 1).



Imagen 1.- Distribución de los serotipos más prevalentes a nivel mundial. (Espigares, 2019). Los distintos serotipos están distribuidos en todo el mundo, siendo los más prevalentes el 5 y 7 en América del norte, el 2,4,9 y 11 en Europa, el 2,9 y 11 en Asia y el 15 en Oceanía.

En México, a partir de 1976 se observaron brotes de pleuroneumonía porcina en varios estados como Ciudad de México, Tlaxcala, Michoacán y recientemente en Jalisco, Puebla, Yucatán, Guanajuato, Querétaro, Estado de México y Sonora. Los serotipos 1-8 fueron los causantes de los brotes, y el más frecuente el serotipo 1. Por lo tanto, la pleuroneumonía porcina está ampliamente distribuida en el país (Enríquez, 2013).

Es posible la supervivencia de la bacteria en el medio ambiente cuando está protegida por materia orgánica, moco o agua. La transmisión de la enfermedad ocurre de forma directa de un animal a otro que diseminan *Actinobacillus pleuropneumoniae* por aerosoles, alimento y aguas contaminadas con secreciones de animales infectados. Los factores predisponentes que favorecen el desarrollo de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina son la presencia de enfermedades como neumonía enzoótica, mala ventilación, elevada densidad de alojamiento y cambios bruscos de temperatura (Imagen 2). La transmisión de esta bacteria también puede ocurrir por vía indirecta (viento, vestimenta, herramientas, cepillos, baldes, etc.), aunque esto es menos frecuente.

La probabilidad de la transmisión indirecta de *App* se relaciona con la calidad de las medidas de bioseguridad implementadas en la granja y la densidad de granjas vecinas a distancia reducida. No se ha demostrado la transmisión de la infección por vectores (pájaros, roedores) (Piñeros, 2018).

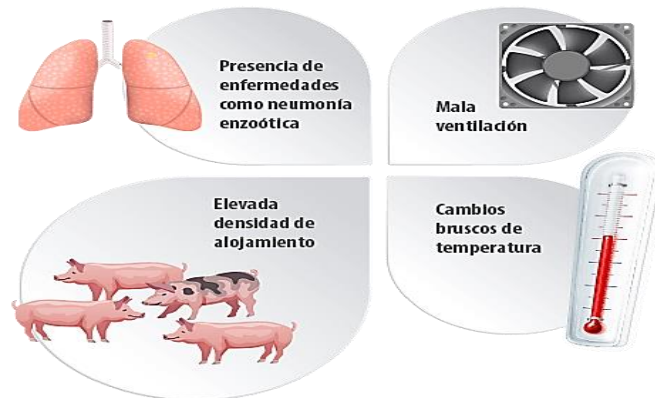


Imagen 2.- Factores predisponentes que favorecen el desarrollo de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (Gottschalk, 2020).

Esta transmisión puede darse entre animales del mismo corral (horizontal) y/o de la madre a su camada (vertical), (Imagen 3). Se considera en general que la entrada de cerdas de reemplazo es uno de los puntos claves de la transmisión de la infección, sobre todo cuando se efectúa el ingreso de animales negativos en una maternidad infectada. Los lechones son excretores de la bacteria en número superior que los que provienen de cerdas más viejas (Gottschalk, 2015).

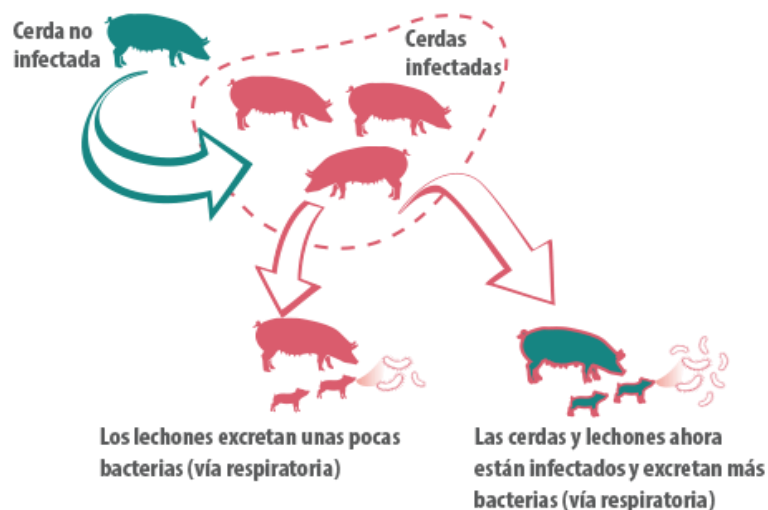


Imagen 3.- Transmisión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Gottschalk, 2020). Al estar conviviendo cerdas no infectadas con cerdas infectadas, estas excretan más bacterias por vía respiratoria.

El periodo de incubación es muy variable (12 horas a 3 días) dependiendo de factores como la virulencia de la cepa, la dosis infectante, condiciones ambientales en que viven los cerdos, entre otros. La edad más receptiva es entre las 6-15 semanas (especialmente entre las 6-8, al disminuir el título de anticuerpos colostrales) (García, 2012).

Actinobacillus pleuropneumoniae ingresa en el cerdo por vía aérea, debido a los aerosoles localizándose inicialmente en cavidad nasal y tonsilas para posteriormente evolucionar hacia las vías respiratorias bajas, a cuya célula se adhiere mediante fimbrias y el lipolisacárido de la pared celular. En esta localización, la supervivencia de la bacteria depende de su capacidad de captar nutrientes como azúcares, hierro y níquel, valiéndose de proteínas de la membrana externa y determinados receptores. Paralelamente la bacteria hace frente a las defensas del hospedador mediante la cápsula, la cual además de poseer propiedades antifagocíticas, proporciona a la bacteria resistencia frente a la lisis mediada por el complemento (López, 2017).

3.2.2.-Patogenia.

Esta patología es más frecuente en animales a partir de los tres meses de vida en los que su forma aguda se traduce en un cuadro febril con signos como anorexia, tos y disnea. En ausencia de una terapéutica eficaz, este proceso puede evolucionar muy rápidamente, produciendo la muerte de los cerdos afectados en cuestión de horas. La forma crónica de evolución es lenta y caracterizada por accesos de tos, pérdida de la condición corporal y pleuritis, como se observa en el Cuadro 1, donde se describen los principales signos clínicos y lesiones de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina. Mientras que su forma subclínica en ausencia de lesiones en los pulmones es uno de los aspectos más peligrosos de esta enfermedad. Muchas granjas están infectadas, pero el equilibrio inmunológico y un manejo adecuado impiden la eclosión de los signos clínicos, sucede a menudo en los rebaños convencionales, que pueden estar infectados simultáneamente no sólo con diferentes serotipos de baja patogenicidad, sino también con serotipos más virulentos. Por lo tanto, la identificación temprana de los rebaños infectados subclínicamente es importante para el control total de la enfermedad, ya que son una de las principales fuentes de transmisión entre los rebaños (Gottschalk, 2015).

Casos	Síntomas clínicos	Lesiones Macroscópicas y Microscópicas
Hiperagudo	<p>Aparición repentina de cerdos muy enfermos con fiebre (41.5-42°C)</p> <p>Anorexia, apatía, vómitos, diarrea, tos, epistaxis, insuficiencia cardiaca y respiratoria.</p> <p>Cianosis en piel de la nariz, orejas, patas y finalmente de todo el cuerpo.</p> <p>Fase terminal: Disnea grave con respiración oral y disminución brusca de la temperatura rectal. Secreción abundante, espumosa y teñida de sangre a través de los ollares y la boca</p> <p>Muerte dentro de las 24 - 36 horas del desarrollo de los signos clínicos.</p> <p>Las tasas de morbilidad y mortalidad oscilan alrededor del 30 - 35%,</p> <p>Ocasionalmente muerte súbita sin signos clínicos.</p>	<p>Tráquea y bronquios están llenos de exudado mucoso, espumoso, fluido hemorrágico.</p> <p>Se observa una intensa congestión, hemorragia y edema alveolar. En estos tejidos los septos interlobulillares aparecen engrosados por el edema intersticial, con los vasos linfáticos dilatados, y presencia de células inflamatorias y eritrocitos entre las redes de fibrina.</p>
Agudo	<p>Aparición de cerdos afectados con fiebre (40.5-41°C).</p> <p>Anorexia, apatía y depresión.</p> <p>Tos, disnea y ocasionalmente respiración por la boca, como se observa en la Imagen 6. Se presenta insuficiencia cardiaca y circulatoria con congestión de extremidades.</p> <p>Pérdida de condición corporal después de 24 horas de iniciarse la enfermedad.</p> <p>La evolución de la enfermedad difiere de unos animales a otros, desde la muerte de animales en pocos días hasta la evolución a la forma crónica, dependiendo de la extensión de las lesiones pulmonares y del tiempo de iniciación del tratamiento terapéutico.</p> <p>La muerte se debe a una combinación de una falla cardiaca y de toxinas producidas por el organismo.</p> <p>La morbilidad es muy alta 10 - 50% y la mortalidad oscila entre el 3 - 30% en animales de engorda y superior al 40% en cerdos más jóvenes.</p>	<p>Los pulmones presentan un cuadro de neumonía fibrinohemorrágica severa, que abarca parte de lóbulos caudales y los lóbulos craneales. Necrosis hemorrágica focal en el lóbulo diafragmático.</p> <p>Los alvéolos contienen células inflamatorias, células descamadas y abundante fibrina. Las zonas que corresponden a infartos presentan necrosis coagulativa asociada con vasculitis y trombosis, (Imagen 4).</p> <p>Alrededor de los focos de necrosis destaca una franja celular basófila formada por acúmulos de neutrófilos modificados de aspecto fusiforme, que llenan la luz alveolar. Las lesiones en vías aéreas se manifiestan en forma de exudado fibrinoso compuesto por células epiteliales, células inflamatorias y fibrina. La pleuritis es serofibrinosa.</p>
Crónico	<p>Aparece después del cuadro agudo. No existe fiebre y se observa tos variable e intermitente, (Imagen 6).</p> <p>Apetito reducido, intolerancia al ejercicio, neumonía caracterizada por respiración abdominal debido a una pleuritis muy dolorosa.</p> <p>Los cerdos sobrevivientes presentan un marcado retraso de crecimiento</p> <p>Los cerdos afectados pueden transportar el microorganismo durante largos períodos de tiempo y por lo tanto representan un riesgo potencial para los cerdos más jóvenes.</p>	<p>Las lesiones se retraen y disminuyen de tamaño a medida que la resolución progresa, hasta que permanecen nódulos de diferentes tamaños (abscesos firmes bien delimitados), la mayoría de ellos localizados en el lóbulo caudal. Estos nódulos pueden asociarse con áreas de pleuritis fibrosa adherente, (Imagen 5).</p> <p>Se presenta proliferación de tejido de granulación alrededor de las zonas de necrosis, que posteriormente son limitadas por una cápsula de tejido conectivo. Estas lesiones contienen un elevado número de microorganismos.</p>

Cuadro 1. Principales signos clínicos y lesiones de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Ferri, 2017).

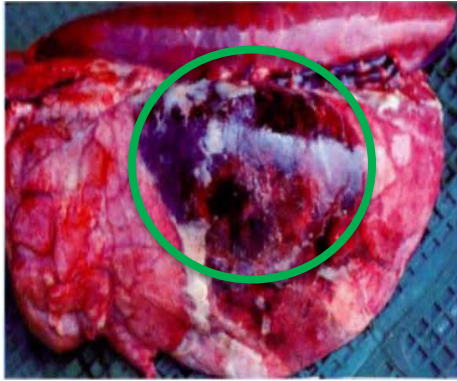


Imagen 4.- Pleumonía hemorrágico-necrosante característica de un cuadro agudo por App (López, 2017). Donde podemos observar las zonas necrosadas que son características de infartos



Imagen 5.- Adherencias pleurales típicas de un caso crónico por App (López, 2017).

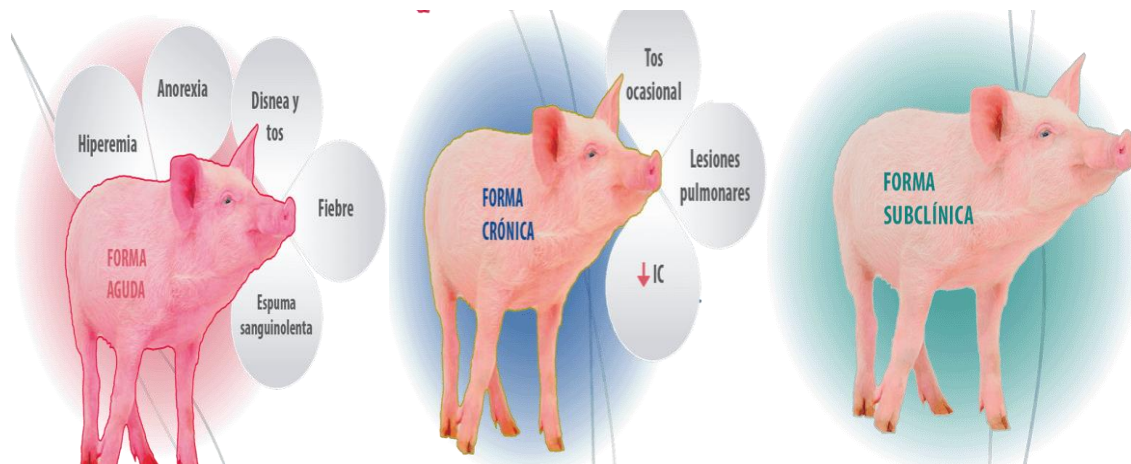


Imagen 6.- Principales signos clínicos de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Gottschalk, 2020). En la forma aguda encontramos hiperemia, anorexia, disnea y tos, fiebre y espuma sanguinolenta. En la forma crónica encontramos tos ocasional y lesiones pulmonares.

3.2.3.-Tratamiento.

El diagnóstico clínico de la enfermedad tras la aparición de los signos clínicos debe realizarse para seleccionar el mejor tratamiento, aunque lo ideal sería realizar el diagnóstico de laboratorio. No obstante, es importante tener en cuenta que el uso de antimicrobianos puede reducir la mortalidad y las lesiones, pero no elimina la infección, ya que los animales quedan como portadores. El primer tratamiento debe realizarse por vía parenteral, ya que los animales enfermos comen y beben menos. Es importante identificar los animales tratados, para poder verificar que no continúen presentando signos clínicos, ya que de lo contrario podría ser indicativo del desarrollo de resistencias antimicrobianas frente al producto utilizado. En las

granjas con brotes agudos, aunque la temperatura sea baja (invierno), es importante mejorar la ventilación para favorecer la correcta circulación del aire (Gottschalk, 2020). En casos de enfermedad aguda, existen dos métodos de prevención:

-Proteger directamente los lechones por vacunación, (Imagen 7). Donde se muestran los diferentes tipos de vacunas para lechones.

-Reducir la carga de *App* en las madres (antibióticos y/o vacunas) y/o en los lechones (antibióticos)

Las vacunas reducen signos clínicos, lesiones en el matadero y aumentan la ganancia de peso, pero no eliminan el estado portador (Gottschalk, 2020)



Imagen 7.- Opciones de vacunación de lechones (Gottschalk, 2020). Ya sea por toxinas purificadas que son vacunas con subunidades, bacterinas que son bacterias muertas enteras o vacunas mixtas que son bacterias muertas enteras enriquecidas con toxinas.

Para reducir la carga de *App*, sobre todo al destete, se puede:

1. Tratar las madres antes del parto y durante el periodo de lactancia con antibióticos.
2. Tratar los lechones al nacimiento y unos días antes del destete (antibióticos de actividad prolongada),
3. Vacunar a las madres, reducir a un máximo de 21 días el destete (Gottschalk, 2020).

Como antimicrobianos eficaces se pueden mencionar diversos antibióticos β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), algunos aminoglucósidos y macrólidos, las quinolonas fluoradas y la tiamulina. En algunos casos, también funciona la combinación de trimetoprim + sulfametoxazol, como se observa en el Cuadro 2, donde se muestra la sensibilidad de *App* frente algunos antibióticos. Recientemente,

se ha utilizado con buenos resultados el macrólido tulatromicina (Gutiérrez, 2014). La antibioterapia resulta eficaz únicamente si es aplicada al comienzo del proceso, ya que un tratamiento usado en fases avanzadas, aunque consiga mitigar la sintomatología y evitar las muertes, no evitará las lesiones crónicas ni asegurará la eliminación del microorganismo de las granjas, que se mantendrá por medio de los portadores asintomáticos (Rubio, 2019)

Se han descrito cepas resistentes es aconsejable la realización previa de un antibiograma. El problema de la resistencia a los antibióticos se incrementa día a día, se comprobó que cuando las bacterias se protegen produciendo biofilm resultan mucho más resistentes a los antimicrobianos que cuando se encuentran de libre flotación o suspendidas (Gutiérrez, 2014).

Serotipo	Sensibilidad	Amoxicilina	Ceftiofur	Doxiciclina	Enrofloxacina	Fosfomicina
1	S	0%	100%	67%	0%	100%
	M	0%	0%	33%	67%	0%
	R	100%	0%	0%	33%	0%
4	S	0%	100%	100%	0%	60%
	M	40%	0%	0%	40%	40%
	R	60%	0%	0%	60%	0%
5	S	50%	50%	75%	25%	50%
	M	0%	50%	0%	25%	50%
	R	50%	0%	25%	50%	0%
7	S	0%	0%	0%	0%	100%
	M	0%	100%	100%	0%	0%
	R	100%	0%	0%	100%	0%
Serotipo	Sensibilidad	Florfenicol	Penicilina	Sulfa- Trimetoprim	Tilmicosina	
1	S	100%	0%	100%	33%	
	M	0%	0%	0%	0%	
	R	0%	100%	0%	67%	
4	S	60%	0%	80%	100%	
	M	40%	40%	0%	0%	
	R	0%	60%	20%	0%	
5	S	0%	50%	100%	100%	
	M	50%	0%	0%	0%	
	R	50%	50%	0%	0%	
7	S	0%	0%	100%	100%	
	M	100%	0%	0%	0%	
	R	0%	100%	0%	0%	

Cuadro 2.- Sensibilidad de *Actinobacillus pleuropneumoniae* frente a antibióticos (Sánchez, 2018).

S: Sensible al antibiótico R: Resistente al antibiótico M: Medianamente

3.2.4.-Prevención y control.

Si las granjas se encuentran libres de pleuroneumonía, se aconsejan medidas estrictas de política sanitaria, como la introducción de cerdos con la garantía absoluta de que no son portadores asintomáticos (lo que se puede averiguar con diagnóstico bacteriano o molecular), como la utilización de la inseminación artificial o como el establecimiento de métodos de cuarentena.

En las unidades de producción donde se encuentran cerdos afectados resulta complicada la eliminación del agente por la persistencia de la condición de portador asintomático, por lo que se debe recurrir a condiciones extremas de limpieza y desinfección. Los animales enfermos deben mantenerse aislados hasta su muerte o sacrificio y deben controlarse todas las condiciones ambientales desfavorables, así como los factores de predisposición (Piñeros, 2018).

Respecto a las vacunas, se han preparado muchas formulaciones diferentes, si bien hasta la fecha no se ha encontrado una vacunación 100% eficaz frente a la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina. Las bacterinas o vacunas inactivadas de células completas solo son eficaces frente al mismo serotipo, por lo que su utilidad se ve bastante restringida.

Para paliar esta situación se ha recurrido a la fabricación de bacterinas polivalentes, integradas por los serotipos más prevalentes en una zona geográfica determinada. A pesar de desarrollar una buena inmunidad protectora, fracasan en la prevención de la transmisión de la enfermedad, al no evitar el desarrollo del estado de portador asintomático (Rubio, 2019).

3.3.- *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

3.3.1.-Características generales.

Actinobacillus pleuropneumoniae es un patógeno exclusivo del ganado porcino, invade tonsilas y tracto respiratorio, por lo que puede ser aislado de la cavidad nasal, tonsilas, oído medio y pulmones de animales infectados (Rodríguez, 2012).

En la Imagen 8 se muestra la morfología de *App* obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión, donde se observa que *Actinobacillus pleuropneumoniae* es una bacteria cocobacilar (0,4 x 1 µm) se presenta en forma sola o en cadenas,

Gram negativa, inmóvil, encapsulada, no esporulada, hemolítica y anaerobia facultativa (Enríquez, 2013).

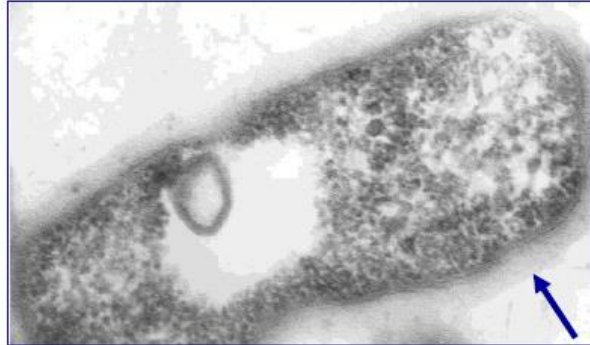


Imagen 8.- Morfología de App con Microscopio Electrónico de trasmisión (Gottschalk, 2020). Es una bacteria perteneciente a:

Phylum: *Proteobacteria*
Clase: *Gammaproteobacteria*
Orden: *Pasteurellales*

Familia: *Pasteurellaceae*
Género: *Actinobacillus*
Especie: *A. pleuropneumoniae*

Bioquímicamente es ureasa positiva, capaz de fermentar manitol, xilosa y ribosa y fermentación variable de lactosa. En función de sus requerimientos de NAD se clasifica en dos biotipos, el biotipo 1 agrupa las cepas dependientes de NAD, y dentro de él se han reconocido los serotipos 1-12 y 15. El biotipo 2 agrupa las cepas NAD independientes reconociéndose los serotipos 13 y 14.

En el Cuadro 3 se muestra la Distribución geográfica de los distintos serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en distintos países (Gottschalk, 2015).

País	Serotipos prevalentes	Serotipo(s) dominante(s)
Argentina	1, 2, 3, 5, 12	1
Australia	1, 2, 3, 7, 12	1
Bélgica	2, 3, 6, 7, 8, 9, 11	3
Brasil	1, 3, 4, 5, 7, 9	5, 3
Canadá	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12	1,5, 7
Chile	1, 5	1, 5
Croacia	2, 7, 8, 9	2, 9
Checoslovaquia	1, 2, 7	2
Dinamarca	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12	2
Francia	2, 3, 7, 8, 9	9
Alemania	2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10	9, 2, 7
Hungría	1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12	3, 2, 7
Italia	1, 2, 3, 4, 5, 7	5
Irlanda	3	3
Japón	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12	1, 2
Corea	2, 3, 5, 7	5, 2
México	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	1, 5
Países Bajos	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11	2, 9, 11
Noruega	2	2
Polonia	1, 2, 5, 9	1, 9
España	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12	4, 7, 2
Suecia	2, 3, 4	2
Suiza	2, 3, 7, 9	2
Taiwán	1, 2, 3, 5	1, 5
Gran Bretaña	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10	2, 3, 8
USA	1, 3, 5, 7, 8, 9	1, 5
Venezuela	1, 7, 4, 2, 3, 6	1

Cuadro 3.- Distribución geográfica de los distintos serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en distintos países. (Gottschalk, 2015).

3.3.2.- Genoma.

El genoma del *A. pleuropneumoniae* es circular como se observa en la Imagen 9, donde se muestra una representación gráfica su genoma, los círculos están numerados del 1 (círculo externo) al 10 (círculo interno). Todos los genes están con un código de color de acuerdo a su función biológica.

La homogeneidad genética entre serotipos se evidenció gracias a los primeros mapas genéticos de los serotipos 1 y 7. Actualmente, se conocen las secuencias completas de los genomas de los serotipos 3 (Xu et al., 2008), 5 y 7, encontrándose en el GenBank® bajo los siguientes números de acceso de CP000687.1, CP000569.1 y CP001091.1, cuyos tamaños son de 2.24, 2.27 y 2.33Mpb; respectivamente, los cuales concuerdan con los resultados del trabajo de algunos investigadores quienes usando la técnica de digestión cromosomal y análisis por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), determinaron un tamaño aproximado de 2.3-2.4Mpb para los genomas de los serotipos 1-12. El DNA

plasmídico también ha sido identificado, con tamaños de hasta 6.0Kb conteniendo genes de resistencia a antibióticos (Rodríguez, 2012).

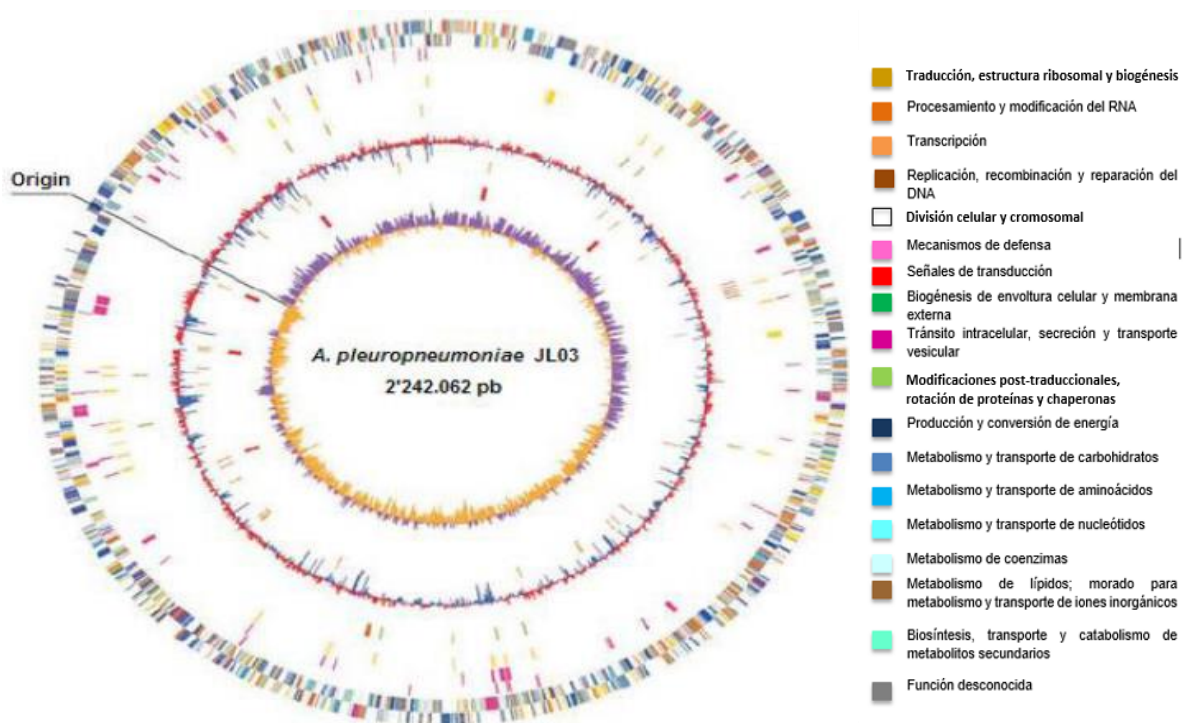


Imagen 9. Representación gráfica del genoma circular del *A. pleuropneumoniae* (Xu, 2008). Donde se muestra una representación gráfica su genoma seccionado en colores de acuerdo a su función biológica.

3.3.3.-Factores de virulencia.

Los factores de virulencia son cualquier componente proveniente de un patógeno que provoca daño en el hospedero, por lo que son los responsables de las reacciones que ocurren durante los procesos de una enfermedad, por tanto, el estudio de los factores de virulencia permite entender los mecanismos usados por la bacteria para causar la enfermedad. La patogénesis de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se considera multifactorial, ya que esta bacteria cuenta con varios factores de virulencia, los cuales intervienen para lograr la infección (Rodríguez, 2012).

En la Imagen 10 se observa un diagrama esquemático de los factores de virulencia ubicados en el entorno celular virtual de *App* donde el color verde olivo y blanco: genes relevantes de adherencia y secreción; rosa: genes relevantes de polisacáridos capsulares; verde: genes relevantes de lipopolisacáridos; magenta: genes relevantes de hierro; morado, Naranja y Azul: porción restante genes

relevantes (toxinas Apx, proteasas y ureasa). Amarillo: proteínas involucradas en la absorción de hierro, el transporte y la regulación (Cápsula) (Xu, 2008).

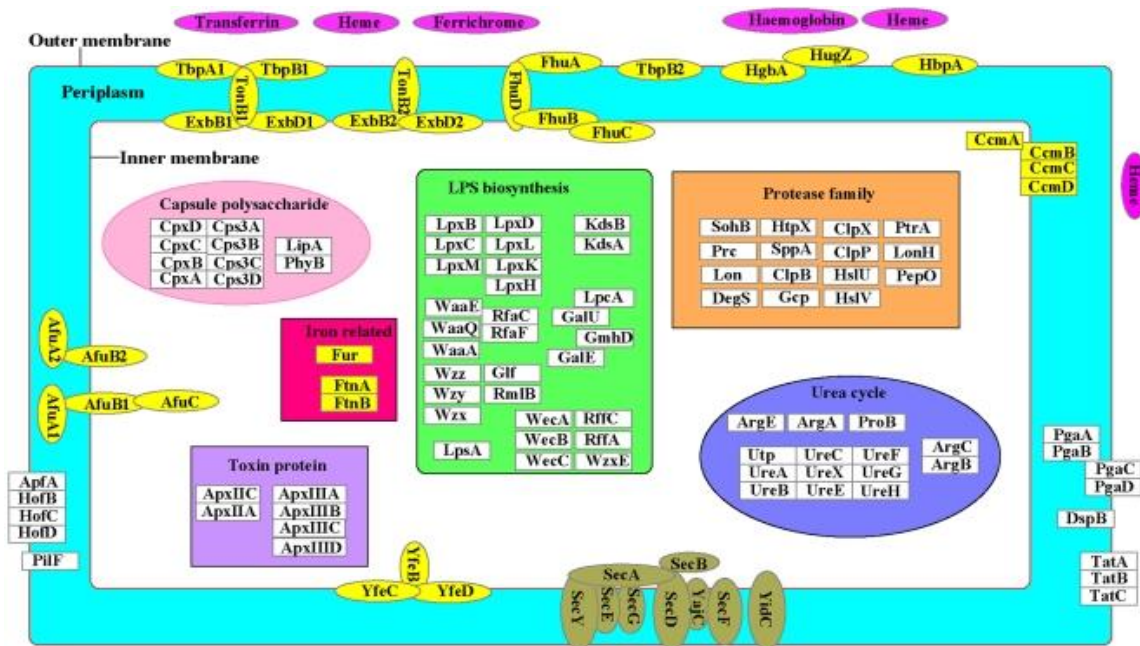


Imagen 10. Diagrama esquemático de los factores de virulencia ubicados en el entorno celular virtual de *App* (Xu, 2008).

- genes relevantes de adherencia y secreción
- genes relevantes de polisacáridos capsulares
- genes relevantes de lipopolisacáridos
- genes relevantes de hierro
- porción restante genes relevantes (toxinas Apx, proteasas y ureasa)
- proteínas involucradas en la absorción de hierro, el transporte y la regulación

3.3.4.-Cápsula.

La cápsula representa un importante factor de virulencia permitiendo la entrada del *Actinobacillus pleuropneumoniae* al hospedador y evadir de sus defensas (García, 2012).

Se localiza alrededor de la membrana externa y se compone de unidades repetidas de oligosacáridos, polímeros de ácido teicoico unidos por enlaces fosfodiéster o polímeros de oligosacáridos unidos por enlaces fosfato, que le confieren una carga negativa. Es la responsable de la especificidad del serotipo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Rodríguez, 2012).

Las propiedades biológicas de la cápsula son: no tiene actividad tóxica, es inerte, no tiene actividad pirogénica, confiere protección frente a la fagocitosis y a la lisis

mediada por el complemento, tanto en presencia de anticuerpos específicos (vía clásica), como en ausencia de estos (vía alternativa), es opsonizada por anticuerpos, e interfiere con la actividad del complemento. Los anticuerpos generados contra la capsula protegen contra la muerte, pero no contra la enfermedad o contra la infección crónica (Enríquez, 2013).

3.3.5.- Lipopolisacárido (LPS).

El lipopolisacárido (LPS) es una molécula glucolipídica anclada a la membrana externa y es considerada como el antígeno de superficie más importante de las bacterias Gram negativas (García, 2012).

Está formado por moléculas complejas compuestas de tres regiones bien definidas:

a) Lípido A: Es la fracción biológicamente activa de la molécula insertado en la membrana externa de la bacteria, se trata de un disacárido (glucosamina) unido a ácidos grasos que por lo general son ácido cáproico, láurico, mirístico, palmítico y esteárico, mediante enlace éster, amido o diéster.

b) Núcleo o core: Oligosacárido compuesto de aproximadamente 10 monosacáridos incluyendo ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO), pentosa, glucosa, galactosa y N-acetil galactosamina, se subdivide en core externo (formado por hexosas) y el core interno (formado por heptosas).

c) Antígeno "O": Compuesto por cadenas largas de polisacáridos organizadas en unidades repetitivas de uno a siete monosacáridos (ramnosa, galactosa y N-acetil-galactosamina) (Burciaga, 2008).

Algunos serotipos muestran similitudes estructurales o tienen cadenas O de LPS iguales, lo que explica la reacción cruzada entre los serotipos 1,9 y 11; 3, 6 y 8; y entre 4 y 7 (Rodríguez, 2012)

Dependiendo de la presencia y del número de unidades repetitivas de antígeno O en el LPS, confiere las características fenotípicas de cepas lisas (serotipos 2, 4, 7), rugosas (serotipos 3, 6) y semirugosas (serotipos 1, 5) (Enríquez, 2013).

El LPS de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provoca únicamente lesiones leves en los pulmones de porcinos sin mostrar lesiones hemorrágicas ni necróticas, indicando que no son los responsables de las lesiones típicas de la pleuroneumonía contagiosa porcina, pero si contribuyen a su formación, incrementando los efectos producidos por las toxinas Apx. El LPS también está implicado en la adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a las células y moco de las vías respiratorias porcinas y, consecuentemente, desempeña un papel fundamental en la colonización e induce neumonía no necrosante con infiltración de neutrófilos.

También es un mecanismo alternativo de adquisición de hierro *in vivo*, a través de su unión a la hemoglobina porcina (Mori, 2007).

Las propiedades biológicas del LPS son: tiene actividad de endotoxina, produce reacción de Schwartzman, actúa como un pirógeno, induce la liberación de mediadores proinflamatorios y estos mediadores activan varias células, como macrófagos y neutrófilos y juega un papel importante en la inflamación aguda (Enríquez, 2013).

3.3.6.-Proteínas de membrana Externa (OMP).

Las proteínas de membrana externa (OMP) pueden localizarse embebidas en la bicapa de fosfolípidos atravesando la membrana o bien con carbohidratos formando glucoproteínas. Las proteínas de membrana externa bacteriana realizan diversas funciones importantes para la célula tales como: intermediación en el transporte entre el periplasma y el ambiente extracelular, adhesinas para la adherencia a células o tejidos del hospedero, enzimas para la respiración y generación de energía, regulación de proteínas de superficie en respuesta a las condiciones de crecimiento en el medio ambiente, receptores de elementos indispensables para su crecimiento, e inducir cierta respuesta inmune. Las OMP de *App* pueden diferir inmunológicamente entre los diferentes serotipos, han sido purificadas proteínas de 14, 24, 32, 40, 42, y 48kDa. Entre las proteínas de membrana externa importantes para la virulencia de *App* se encuentran FhuA y HgbA las cuales le sirven como receptores para la adquisición de hierro a partir de fuentes como ferricromo (FhuA) o como hemoglobina (HgbA) (Burciaga, 2008).

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

3.3.7.-Sistema de adquisición de hierro.

El hierro es un nutriente esencial para el crecimiento de *App* quien a fin de disponer de cantidades adecuadas expresa dos distintas proteínas con afinidad por transferrina: TbpA y TbpB las cuales son proteínas que forman canales transmembranales para el transporte de hierro a través de la membrana externa; de este modo, el patógeno utiliza la transferrina del hospedador como única fuente de hierro necesaria para su supervivencia y su virulencia. Sin embargo, a fin de poder

incorporar hierro, la bacteria también requiere de energía, misma que es proporcionada por proteínas de membrana externa transductoras de energía pertenecientes al sistema de proteínas Ton B las cuales también participan en la captación de hierro vía receptores de sideróforos y vía captación de hierro del Hem producido por la acción de hemolisinas de *App* (Monter, 2010).

3.3.8.-Exotoxinas.

Las exotoxinas bacterianas son proteínas extracelulares solubles, que, al ser liberadas al medio por el organismo vivo, se activan bioquímicamente. Estas toxinas pertenecen a la familia de toxinas Repeats in toxin (RTX), formadoras de poros, con toxicidad hacia los neutrófilos y macrófagos alveolares. Se han identificado cuatro tipos de citotoxinas en *Actinobacillus pleuroneumanae*, las cuales son llamadas toxinas Apx I, Apx II, Apx III y Apx IV, cuyo patrón fenotípico en su expresión determina el grado de virulencia entre los diferentes serotipos, como se observa en el Cuadro 4, donde se describen las principales características de estas toxinas (Enríquez, 2013).

- **Apx I:** Proteína de 105kDa, fuertemente hemolítica y citotóxica. Es codificada por el operón *ApxI*, que tiene 4 genes: *ApxIA* (pretoxina), *ApxIB*, *ApxIC* (activador) y *ApxID* (aparato de secreción). La proteína *ApxI* la producen los serotipos 1, 5a, 5b, 9, 10 y 11 y por lo tanto son los más virulentos. Ejerce su efecto sobre células fagocíticas (macrófagos alveolares y PMN) permitiendo a la bacteria evadir la primera línea de defensa del hospedero, a la vez que interviene en el desarrollo de lesiones sobre células endoteliales y epiteliales pulmonares.
- **Apx II:** Proteína de 103-105kDa, débilmente hemolítica y moderadamente citotóxica, es codificada por el operón *ApxII* y consiste de 2 genes: *ApxIIA* y *ApxIIC*, utiliza los productos de los genes *ApxIB* y *ApxID* para secretarse, la producen todos los serotipos excepto el 10.
- **Apx III:** Proteína de 120kDa, es no hemolítica y fuertemente citotóxica, codificada por el operón *ApxIII* y contiene 4 genes: *ApxIIIA*, *ApxIIIB*, *ApxIIIC* y *ApxIIID*. *ApxIII* la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8.
- **Apx IV:** Tienen actividad citotóxica y la producen todos los serotipos. Al parecer no es capaz de ocasionar lesiones, sin embargo, está considerada como una toxina característica de especie (Burciaga, 2008).

La actividad hemolítica de estas proteínas es probablemente la responsable de las lesiones iniciales de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, caracterizadas por ser

hemorrágicas y necrosantes. Las toxinas Apx son el principal factor de virulencia y en su ausencia la cepa de *App* no es virulenta (Enríquez, 2013).

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

Cuadro 4.- Características de toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (López, 2017).

- Actividad hemolítica: La hemólisis (eritrocateresis) es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes).
- Actividad citotóxica: Una sustancia citotóxica es aquella sustancia que destruye las células, células anómalas o cancerosas, agentes infecciosos o incluso tejidos.

3.3.9.-Proteasas.

Las proteasas hidrolizan componentes proteicos del huésped contribuyendo a su invasión, *Actinobacillus pleuropneumoniae* es capaz de secretar enzimas proteolíticas las cuales tienen actividad sobre varios sustratos como son la gelatina, la inmunoglobulina A y la hemoglobina porcina, de esta manera, facilita la colonización de las mucosas del tracto respiratorio del cerdo y la obtención del hierro combinado en esta proteína plasmática (Monter, 2010).

3.3.10.-Fimbrias.

Las fimbrias están presentes en una gran variedad de patógenos y están relacionándolas con la adherencia íntima a los alveolos pulmonares y los bronquiolos. Se ha descrito la presencia de fimbrias 0.5 a 2nm de diámetro y de 60 a 450nm de longitud, identificadas por microscopia electrónica. Estas desaparecen en los primeros pases *in vitro* (Mori, 2007).

3.4.- Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

3.4.1.-Necropsia.

La presentación clásica en la necropsia son lesiones fibrinosas y necróticas demarcadas, que se ubican, generalmente, en el lóbulo diafragmático, cardíaco y lóbulos apicales. Estas áreas neumónicas son oscuras y consolidadas, y la pleuresía fibrinosa presente es notoria, especialmente en los lugares neumónicos. Por otro lado, los cerdos crónicamente infectados tienen adherencias pleurales y abscesos que pueden ser encontrados en el pulmón u otros tejidos. Sin embargo, las lesiones descritas anteriormente no son patognomónicas de pleuroneumonía porcina, por lo que se recomienda confirmar el hallazgo, a través de otras técnicas de diagnóstico, más sensibles y específicas, las cuales requieren de toma de muestras (Williams, 2000).

3.4.2.-Toma de muestra.

Debe incluir material procedente de las lesiones pulmonares con pleuritis, como se observa en el Cuadro 5, en donde se describen los tipos de muestras respiratorias de cerdo para el diagnóstico de *App*. Entre las muestras más utilizadas se incluyen los lavados de traqueobronquiales, porciones del pulmón afectadas (Imagen 11), biopsias tonsilares o tonsilas completas recolectadas en el matadero, para simplificar el procedimiento pueden recogerse varias muestras mediante impregnación de escobillones o hisopos en el parénquima pulmonar al que se accede durante la necropsia después de cauterizar con una espátula al rojo la superficie del órgano.

En cualquier caso, es conveniente la utilización de medios de transporte, como el medio de Stuart o de Amies, que prolongan la supervivencia del microorganismo. Para estudios histopatológicos las muestras deben fijarse en formol al 10% tamponada. Para otras técnicas de diagnóstico, el medio de transporte debe ser el adecuado y en lo posible las muestras deben ser refrigeradas (Williams, 2000).

TIPO DE MUESTRA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Pulmones	Muestra idónea en caso de bajas. Permite un diagnóstico completo.	Requiere animales muertos o sacrificados. Riesgo de que el animal analizado no sea representativo del grupo.
Lavados broncoalveolares o raspados bronquiales	Muestreo de animales vivos. Permite muestrear un mayor número de animales. Permite el cultivo microbiológico, realización de antibiograma y técnicas de PCR. Aporta información de los agentes presentes en pulmón.	La toma de muestra requiere personal entrenado y material específico. No se puede realizar estudio histopatológico.
Fluidos orales	Muestreo de un mayor número de animales en una única muestra. Permite realizar tanto búsqueda de antígenos (PCR) como de anticuerpos (ELISA). Buen sistema de monitorización en explotaciones asintomáticas	Los animales enfermos no suelen interactuar con las cuerdas. No se puede realizar cultivo microbiológico. La conservación de la muestra es crítica para asegurar un buen resultado. No se puede realizar estudio histopatológico.
Hisopos nasales	Muestreo sencillo de animales.	Presencia de cepas no patógenas en vías respiratorias altas. Es posible no detectar agentes presentes en pulmón. No se puede realizar estudio histopatológico.

Cuadro 5.- Tipo de muestras respiratorias de cerdo para el diagnóstico de *App*, ventajas e inconvenientes. (Chacón, 2017).

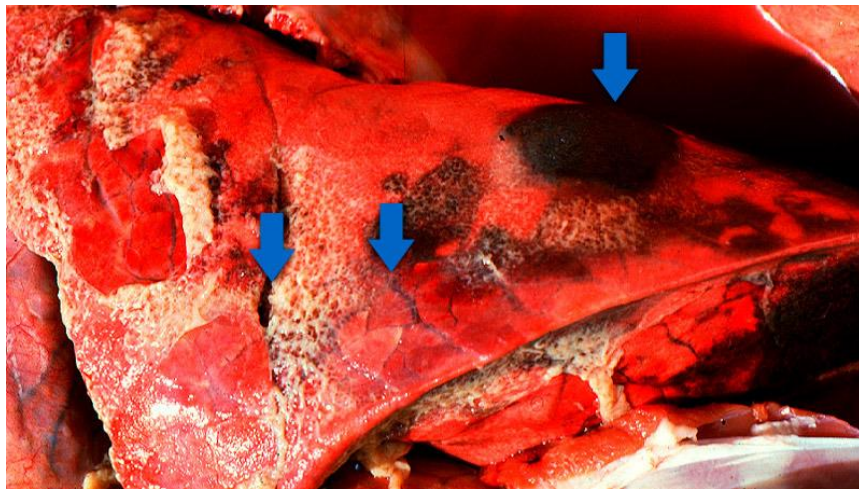


Imagen 11.- Pulmón con hallazgos de pleuropneumonia porcina: 1) áreas consolidadas de color rojo oscuro a negro, 2) edema interlobular y 3) pleuritis fibrinosa. (Gottschalk, 2017)

Los lavados broncoalveolares y raspados bronquiales (Imagen 12), son muy útiles en procesos respiratorios dónde no hay bajas, pero sí aparecen animales con signos respiratorios tos o disnea; que permite muestrear un número importante de animales

agrupándolos por edades, naves o estado de producción. Aporta información exacta de los microorganismos presentes a nivel pulmonar (Chacón, 2017).

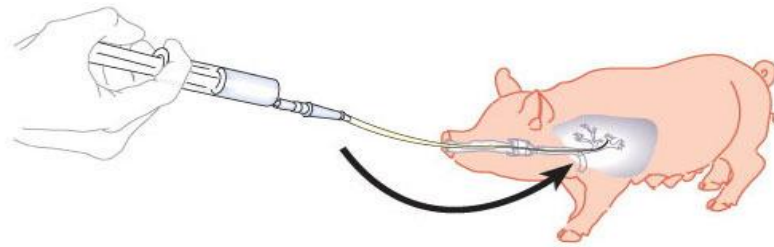


Imagen 12. Lavados broncoalveolares o raspados bronquiales (Chacón, 2017). Se muestra la técnica del lavado broncoalveolar, que usa para recoger una muestra de tejido de los pulmones para su análisis. Durante el procedimiento, se introduce una solución salina a través del broncoscopio para lavar las vías respiratorias y recoger una muestra de líquido.

3.4.3.-Histología.

La lesión histológica se caracteriza por necrosis de los pulmones, con hemorragia, infiltración de neutrófilos, macrófagos y activación plaquetaria, trombosis vascular, edema y exudado fibrinoso, como se observa en la Imagen 12, en donde se muestra un corte histológico de pulmón de cerdo inoculado con *App*. Además, se pueden ver microcolonias de organismos en los alvéolos infectados, que pueden causar bacteriemia (López, 2017).

Es importante señalar que el agente etiológico no se puede determinar únicamente con la inspección postmortem e histopatología. Además, lo más completo del diagnóstico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* es identificar los planteles infectados subclínicamente, ya que sus animales portadores son los principales responsables en la diseminación de la enfermedad (Ferri, 2017).

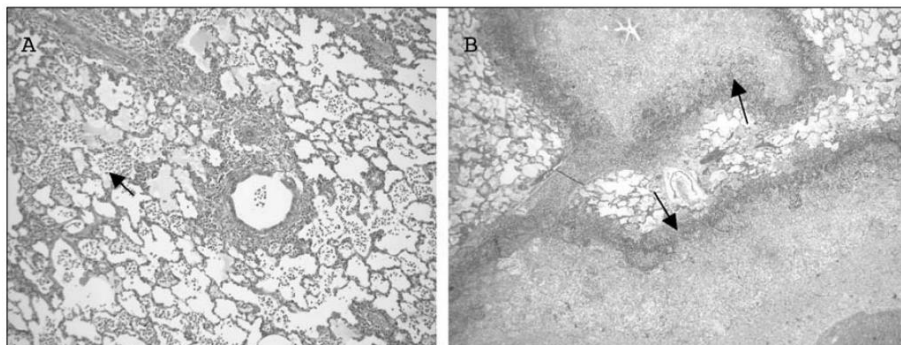


Imagen 13.- Cortes histológicos de pulmones de cerdos experimentalmente inoculados con *App*. **A:** Se aprecia un infiltrado leucocitario alveolar compuesto por macrófagos activados y polimorfonucleares (PMNs)(flecha), y edema alveolar leve (H y E; aumento 100X). **B:** Se aprecia un intenso infiltrado leucocitario alveolar rodeado por un halo inflamatorio y la neoformación de tejido fibroso en la periferia (flechas) (H y E; aumento 32X) (Muñoz. 2010)

3.4.4.-Pruebas diagnósticas para *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

El aislamiento e identificación de *App* mediante pruebas microbiológicas, utilizando medio de cultivo selectivo y pruebas bioquímicas, es esencial para probar antimicrobianos y para la producción de vacunas autógenas. La detección molecular mediante el DNA de *App* por PCR, puede realizarse a partir de aislados bacterianos o directamente de tejidos. Cuando los cerdos han sido tratados con antibióticos y no es posible aislar la bacteria. La detección y clasificación de los serotipos con base a los anticuerpos frente a *App* puede confirmar una exposición previa o la presencia de anticuerpos adquiridos pasivamente. Existen dos tipos de pruebas serológicas: las basadas principalmente en ApxIV, que detectan todas las cepas de *App* sin discriminación entre serotipos, y las basadas en el polisacárido capsular (CPS) o en la cadena O de los lipopolisacáridos (LPS), que son específicas de serotipo (Gerber, 2016).

3.4.5.-Aislamiento bacteriológico.

Una vez recibidas las muestras de pulmón, éstas deben ser teñidas con tinción Gram, en donde se observarán numerosos cocobacilos gramnegativos. La dificultad de aislar *Actinobacillus pleuropneumoniae* se relaciona con la presencia de otras bacterias en pulmones, las cuales pueden inhibir el crecimiento de la misma en los medios de cultivo.

Actinobacillus pleuropneumoniae se divide en dos biotipos, el I es dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), por lo que se requiere añadir en el laboratorio a los medios de cultivo NAD en una proporción del 0.025%, o emplear variantes de agar sangre ovina al 5% inoculadas con una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* beta hemolítico, de este modo, *Actinobacillus pleuropneumoniae* obtiene el NAD que necesita, y después de 12 horas de incubación aeróbica crecen colonias con satelitismo alrededor de la estría de *Staphylococcus aureus*, (Imagen 14, inciso C) y produce una zona de hemólisis completa: Christie Atkins-Munch-Petersen o Prueba de CAMP, (Imagen 14, inciso D). El medio de cultivo selectivo Pleuropneumonia like organisms (PPLO) igualmente suplementado con NAD, ha demostrado ser altamente sensible y específico (Imagen 14, inciso B).

Otro medio que se puede utilizar es el agar Chocolate (Agar sangre alterada por calentamiento con liberación del factor V), el cual permite el crecimiento de la bacteria en una atmósfera del 5% de CO₂, a 37°C.

Las cepas del Biotipo II no requieren de factor NAD para su crecimiento 1,3 *Actinobacillus pleuropneumoniae* crece a 37° C, preferentemente en presencia de CO₂ (5%), al menos en cultivos iniciales. En 24 a 48 horas produce colonias redondas, pequeñas, de 0.5 – 1 mm de diámetro, lisas y brillantes u opacas y de aspecto céreo, de color gris blanquecino, como se observa en la Imagen 14, inciso A (Hernández, 2002). El agar sangre es un medio adecuado que se utiliza con una estría nodriza de especies producidas de factor V, con las que App satelitizan; además posee la ventaja de que permite observar la presencia de hemólisis como se muestra en la Imagen 14, inciso E (Gutiérrez, 2014)

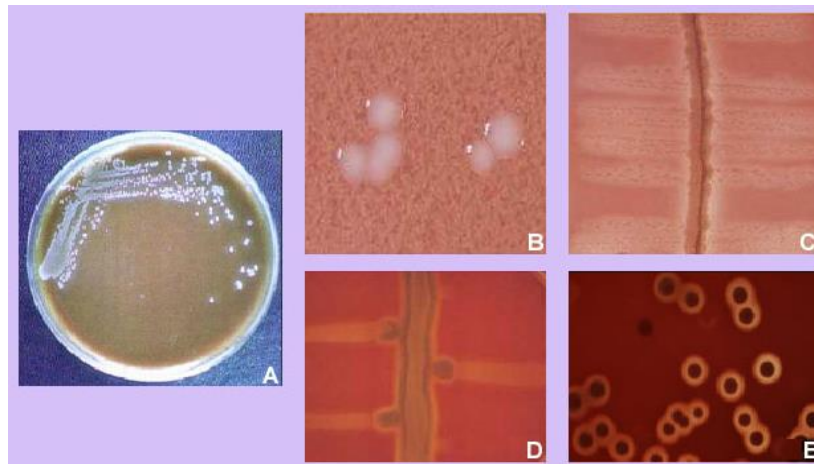


Imagen 14.- Cultivo de App en medios sólidos (Gutiérrez, 2014). A: colonias en agar chocolate; B: colonias en agar PPLO enriquecido con NAD; C: satelitismo en agar sangre. D: Efecto CAMP; E: colonias hemolíticas en la presencia de sangre.

El caldo PPLO se emplea principalmente para el aislamiento y cultivo de *Mycoplasma spp.* Este microorganismo se descubrió en un caso de pleuroneumonía en una vaca, y se conoce como "organismos parecidos a pleuroneumonía" o PPLO. (Gottschalk, 2012). Para su identificación se realizan pruebas bioquímicas que nos permiten diferenciar a especies semejantes, como se observa en el Cuadro 6.

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

Cuadro 6.- Características bioquímicas del *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1. (Rodríguez, 2012). ^a Las cepas del biotipo 2, son no-dependientes de NAD. ^bCAMP: *Christie-Atkins-Munch-Petersen*. (+) Positivo, (-) Negativo

La identificación bioquímica se puede llevar a cabo para demostrar el fenómeno CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen), actividad ureasa y fermentación del manitol. Sin embargo, en infecciones mixtas se recomienda el uso de medios selectivos. Debido a todo lo anterior, la identificación por aislamiento puede ser confusa, complicada y relativamente insensible, especialmente en casos crónicos. Además, no es la única bacteria que es NAD dependiente, por lo que son necesarias técnicas moleculares para su identificación. No obstante, el aislamiento primario entrega información para conocer la susceptibilidad a los antimicrobianos del serotipo específico y sigue siendo considerada, por algunos investigadores, como la técnica estándar "estándar de oro" para diagnosticar *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Finalmente, el aislamiento bacteriano no es viable en animales portadores, que son los principales responsables del contagio de criaderos que están libres de la enfermedad. Además, la técnica requiere mucho tiempo y trabajo, por lo que hoy en día es más recomendable identificar el organismo a través de técnicas moleculares y utilizar las técnicas serológicas que nos dirá si el cerdo estuvo en contacto en algún momento con *App* y se mide su respuesta inmune (Dennis, 2015).

3.5.- Caracterización de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Para llevar a cabo una caracterización más a fondo de la bacteria se pueden realizar diversas pruebas, como se observa en el Cuadro 7, donde se describe el objetivo de cada prueba para el diagnóstico y caracterización de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, el tipo de muestra que se necesita y las consideraciones que hay que tomar en cuenta.

- Serotipado tradicional: La caracterización de cepas de *App* por serotipado tiene más interés para los porcicultores. El conocer los serotipos específicos de una granja puede ayudar en el estudio epidemiológico y en la selección de vacunas. De todos los test serológicos desarrollados para el serotipado de *App*, la coagulación es el más utilizado. El serotipado puede diferenciar entre 15 cepas de *App*; sin embargo, algunos aislados pueden presentar reacciones cruzadas frente a más de un antisuero, que son difíciles de interpretar. En estos casos, puede recurrirse a otras pruebas como la difusión en agar gel o la hemaglutinación indirecta (Gottschalk, 2015).
- Serotipado molecular: Las técnicas moleculares se han desarrollado para superar el inconveniente de obtener antisueros específicos y evitar las reacciones cruzadas de algunos aislados de *App*. Algunas de ellas identifican el serotipo de forma precisa, mientras que otras detectan grupos de serotipos. La mayoría de las pruebas PCR capaces de diferenciar cepas de *App* se dirigen a genes del polisacárido capsular (CPS) específicos y pueden diferenciar los serotipos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 y 12. En este momento, la PCR para identificar o diferenciar claramente cepas del serotipo 13, 9 y 11 no está disponible comercialmente. Como las pruebas de serotipado tradicionales, el serotipado por PCR también requiere un aislamiento inicial de las cepas bacterianas de interés (Gottschalk, 2015).
- Serotipado serológico: La prueba ApXIV ELISA sirve como herramienta de monitorización y si es positivo el test ELISA, el lipopolisacárido (LPS) permite identificar serogrupos (reacciones cruzadas LPS: 1/9/11; 4/7; 3/6/8/15) o serotipos individuales (2, 5, 10, 13 y 14). Algunos test comerciales disponibles identifican serogrupos como 1/2, 3/6/8/15, 4/5/7 o 10/12. Los serotipos 6, 8, 12 y 15 pueden estar presentes en rebaños en ausencia de signos clínicos. Los cerdos infectados por estos serotipos se detectan más fácilmente por serología, especialmente cuando se analiza un número bajo de animales por rebaño (Gottschalk, 2015).

Prueba	Objetivo	Tipo de muestra	Consideraciones
Aislamiento bacteriano	Confirmación de App Prueba de resistencia antimicrobiana Subsecuente caracterización posterior	Tejido pulmonar con lesiones Tonsilas o hisopos de tonsilas	Las tasas de aislamiento son muy bajas en los casos crónicos, en los animales tratados con antibióticos y en las muestras de matadero. La sensibilidad puede mejorar utilizando separación inmunomagnética, sin embargo, esta técnica es costosa y no está disponible ampliamente
PCR	Confirmación de App	Aislados bacterianos Tejido pulmonar Tonsilas o hisopos de tonsilas	El gen ApxIV u otros marcadores de App pueden utilizarse para monitorizar los rebaños libres
Serotipado tradicional	Determinar qué serotipo está presente	Rápida confirmación de la identificada	La reacción cruzada entre algunos serotipos
Serotipado molecular	Determinar qué serotipo está presente	Aislados bacterianos Tejido pulmonar Tonsilas o hisopos de tonsilas	Esta prueba cada vez se utiliza más por los laboratorios de diagnóstico veterinario. La PCR específica de serotipo es sensible y específica, pero realizar la prueba para varios serotipos incrementa el coste.
ELISA	Detección de anticuerpos frente al gen ApxIV que es específico de App	Suero Fluidos orales	Es un test disponible de bajo coste. Es adecuado para monitorizar rebaños libres de App pero menos útil en rebaños que se sabe que están infectados
ELISA específico de serotipo	Detección de anticuerpos frente a varios serotipos de App	Suero Fluidos orales	Es una prueba sensible y específica, pero realizar para varios serotipos incrementa el coste

Cuadro 7.- Pruebas para el diagnóstico y caracterización de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Gerber, 2016).

3.5.1.- Técnicas inmunológicas para detectar antígenos.

3.5.1.1.-Inmunohistoquímica (IHQ).

Esta técnica utiliza anticuerpos (Ac) conjugados con enzimas como inmunoperoxidasa o fosfatasa alcalina, como se observa en la Imagen 15, donde se muestran los componentes de la IHQ. La inmunohistoquímica directa requiere de Ac marcados dirigidos a un epitopo específico del *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Por otra parte, la inmunohistoquímica indirecta consiste en un complejo de Ac específico al antígeno (Ag) y un anticuerpo Ac marcado con el complejo enzimático, es decir que se requiere de Ac monoclonales para cada serotipo (Dennis, 2015).

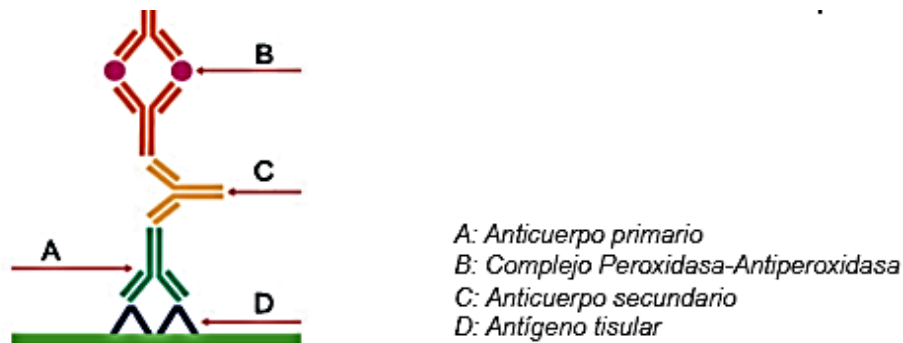


Imagen 15.- Inmunohistoquímica, por el método indirecto de Peroxidasa-Antiperoxidasa (Delgado, 2012). (A) es una inmunoglobulina que se une específicamente a una proteína concreta u otra biomolécula, (B) este complejo está constituido por dos moléculas de inmunoglobulinas y tres de peroxidasa; es necesario que se desarrolle el complejo peroxidasa antiperoxidasa y obtener anticuerpos por inmunización de animales de la misma especie que los utilizados en la obtención del anticuerpo primario, (C) se unen a los anticuerpos primarios y se utilizan habitualmente para detectar y visualizar un anticuerpo primario y (D) es una molécula detectada en la mayoría de los distintos tipos de carcinomas de pulmón, así como en muchos otros de distintas localizaciones.

Su ventaja es que puede estudiar la relación del agente con las células que atacan, lo que demuestra su gran utilidad en investigación, pero no para la industria porcina, por ser una técnica laboriosa y costosa (Hernández, 2002).

3.5.1.2.-Inmunofluorescencia (IF).

En esta técnica se emplean anticuerpos preparados frente a la proteína que se desea detectar marcados con moléculas fluorescentes, (Imagen 16). En esta prueba se aprecia si hubo unión del anticuerpo con el antígeno por la fluorescencia emitida, que se observa bajo microscopio de luz ultravioleta. La inmunofluorescencia directa tiene la limitación del marcaje con un fluorocromo de cada uno de los anticuerpos necesarios para cada una de las sustancias a investigar. Para evitar esto la inmunofluorescencia indirecta, trata el tejido o células con antiseros anti-antígeno y secundariamente anti-inmunoglobulinas marcadas con un fluorocromo (Dennis, 2015).

En esta técnica se requiere un microscopio de fluorescencia, lo que se convierte en una desventaja, además, con esta técnica se han detectado reacciones cruzadas (Hernández, 2002).

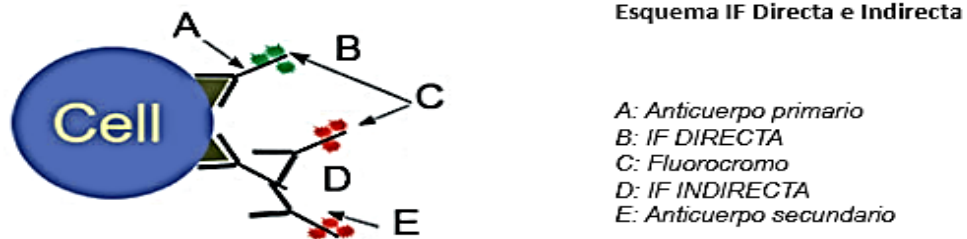


Imagen 16.- Inmunofluorescencia Directa e Indirecta (Delgado, 2012). Anticuerpo primario es una inmunoglobulina que se une específicamente a una proteína concreta u otra biomolécula, **fluorocromo es** un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente y **anticuerpos secundarios** se unen a los anticuerpos primarios y se utilizan habitualmente para detectar y visualizar un anticuerpo primario.

3.5.1.3.-Separación inmunomagnética (IMS).

Técnica altamente sensible que aísla al agente utilizando imanes (pequeñas esferas) cubiertos con anticuerpos específicos al serotipo de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, como se observa en la Imagen 17, donde se esquematiza la técnica de separación inmunomagnética. La aplicación de un campo magnético permite separar las células unidas a las esferas (selección positiva) de las células no unidas (selección negativa). Luego, la microbiota contaminante es lavada y se obtiene un cultivo 1,000 veces más puro que el cultivo directo en agar. La principal desventaja es su elevado costo (Dennis, 2015).

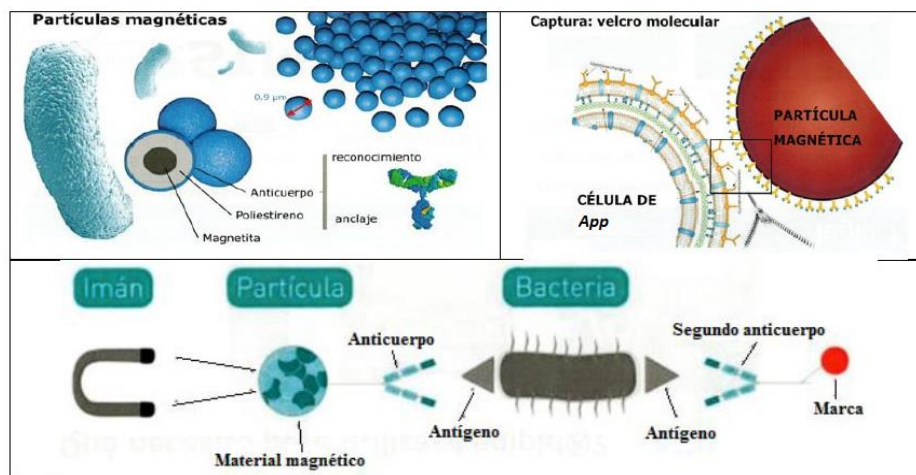


Imagen 17.- Separación inmunomagnética. (Calderón, 2007).

3.5.2.- Técnicas que detectan anticuerpos.

Actinobacillus pleuropneumoniae es una bacteria que presenta una complejidad particular, debido a la existencia de varios serotipos. Es así como en un mismo plantel pueden coexistir varios serotipos y otras bacterias relacionadas, convirtiendo al diagnóstico serológico en todo un reto. Algunos de los exámenes serológicos que se han utilizado en la detección del *Actinobacillus pleuropneumoniae* son los siguientes:

3.5.2.1.-Coaglutinación.

En esta técnica se hace visible el complejo Ag-Ac, al entrar en contacto los anticuerpos mediante los dos puntos de unión con el antígeno, establecen entramados de muchas moléculas de Ag-Ac. Esta aglutinación de partículas antigénicas forma grumos, para que estos grumos sean fácilmente visibles macroscópicamente, los anticuerpos están unidos por el fragmento Fc a partículas inertes de mayor tamaño, tales como partículas de látex; como se observa en la Imagen 18, donde se esquematiza la técnica de Coaglutinación (Dennis, 2015).

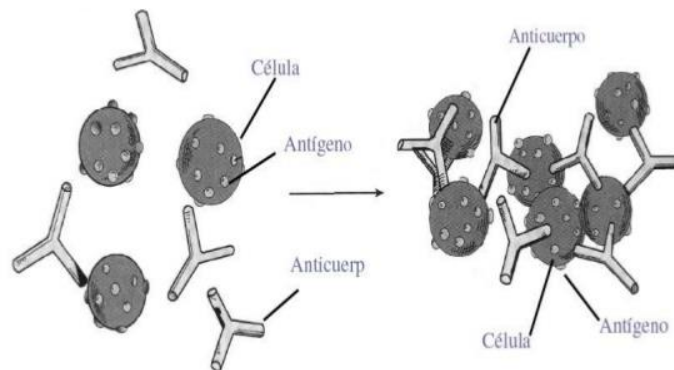


Imagen 18.- Coaglutinación (Calderón, 2007). Ag-Ac complejo formado por la unión no covalente de un antígeno con un anticuerpo (inmunocomplejo). Tiene una función defensiva y de protección frente a diversos agentes, pero en ocasiones es responsable de enfermedades por mecanismos de interferencia física, inflamación, citotoxicidad, opsonización o alteración funcional

Para su desarrollo se requiere una cepa bacteriana que sintetice grandes cantidades de proteína A (cepa de *S. aureus*), que se une a la región Fc de las IgG, quedando libre la región Fab, dispuesta para reaccionar con su antígeno específico. Esta técnica es extraordinariamente rápida, pero en general adolece de buena sensibilidad, se han presentado reacciones cruzadas, entre los serotipos 1, 9 y 11 (Rodríguez, 2012).

3.5.2.2.-Fijación del complemento.

El test se basa en la obtención de antígenos específicos para cada uno de los 15 serotipos, que reaccionan frente al suero investigado. Los antígenos se obtienen del sobrenadante de una suspensión de bacterias. Adicionalmente, se requiere de complemento, suero bovino fetal, y del suero problema, los que son incubados durante 12 horas. Luego de este período se añaden los glóbulos rojos. Si el suero porcino contiene anticuerpos específicos frente al antígeno del serotipo investigado, interaccionarán con él y el complemento se unirá a la porción Fc del anticuerpo. Esto agotará el complemento presente y evitará la lisis de los glóbulos rojos en el sistema de reacción, como se observa en la Imagen 19, donde se esquematiza la técnica de Fijación del complemento (Dennis, 2015).

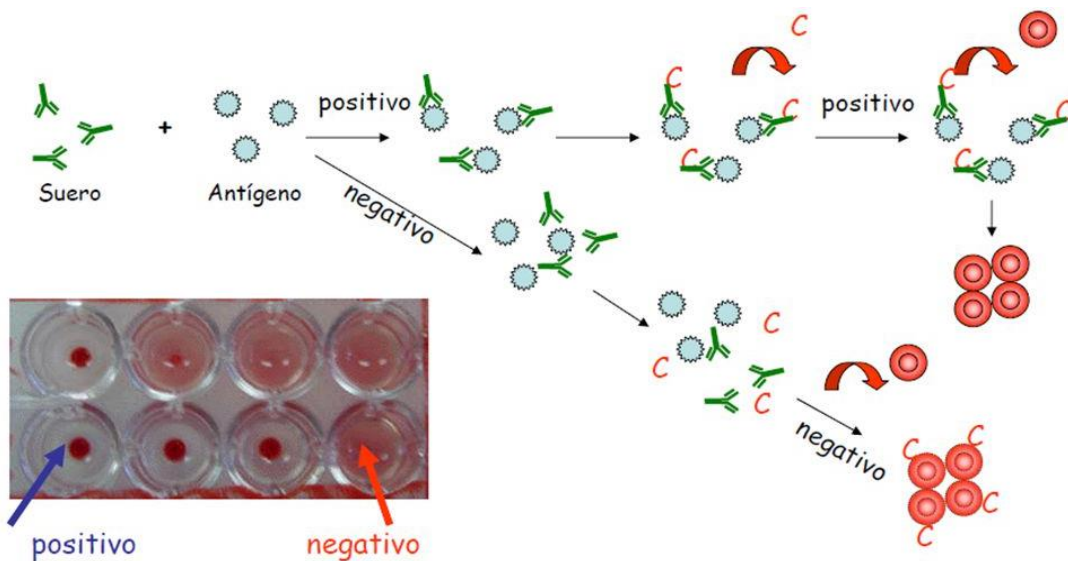


Imagen 19.- Fijación del Complemento (Calderón, 2007).

En el caso del *Actinobacillus pleuropneumoniae* fue inicialmente utilizado para detectar diferentes anticuerpos; sin embargo, presenta una sensibilidad y especificidad muy reducida para ser una técnica confiable en la detección rutinaria de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en laboratorios clínicos o como prueba de campo (Ferri, 2017).

3.5.2.3.-ELISA (Ensayo por inmovilización ligada a enzimas).

La identificación de los complejos Ag-Ac se hace mediante el empleo de enzimas unidas al antígeno, o unidas al anticuerpo, como se observa en la Imagen 20, donde se muestran los diferentes tipos de ELISA. El ensayo de ELISA puede ser directo o no competitivo, en esta técnica se tapiza la placa con el anticuerpo específico frente al antígeno a determinar, posteriormente se añade la muestra con el antígeno. Después se adiciona el anticuerpo secundario marcado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble, este producto es cuantificado mediante el lector de ELISA. El método indirecto o competitivo se diferencia del caso anterior en que se añaden los anticuerpos, previamente incubados con la muestra, los anticuerpos que no se han unido a los antígenos de la muestra lo harán a los antígenos de los pocillos. Como enzimas se suelen utilizar la peroxidasa, la galactosidasa o la glucosa oxidasa (Dennis, 2015).

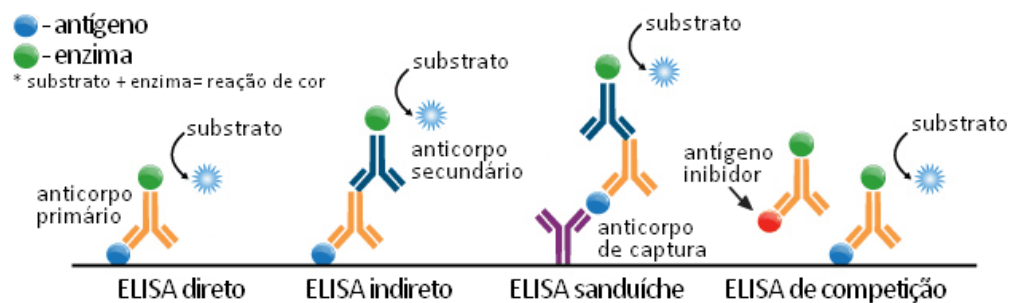


Imagen 20.- Inmunoensayo enzimático ELISA (Calderón, 2007).

Antígeno: sustancia que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.

Enzimas: son moléculas orgánicas que actúan como catalizadores de reacciones químicas, es decir, aceleran la velocidad de reacción.

Sustrato: sustancia sobre la que actúa una enzima.

El diagnóstico serológico basado en LPS y antígenos capsulares de *Actinobacillus pleuropneumoniae* nos ofrece hoy en día varias pruebas ELISA (serodiagnósticos) específicos para ciertos serotipos como 1, 2, 4, 5, 6 y 7. Sin embargo, no se encuentra disponible un test comercial único que discrimine entre los distintos serotipos (Rodríguez, 2012).

Un estudio llevado a cabo por Inzana y Fenwick en 2001 desarrollaron un ELISA específico para los serotipos que afectan principalmente a Norteamérica (1, 5 y 7). Debido al problema de las reacciones cruzadas, por epitopos comunes entre los diferentes serotipos y otras especies de bacterias, este estudio utilizó el polisacárido

o antígeno capsulares por ser serotipo específico. Se realizaron ELISAs específicos para cada serotipo y un ELISA que combinó a los tres serotipos en una sola placa, obteniendo resultados positivos, para detectar diferentes anticuerpos (provenientes de una misma muestra de suero) contra serotipos distintos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Dreyfus en 2004 desarrolló un ELISA indirecto utilizando la exotoxina ApxIV recombinante, que presenta la particularidad de ser producida por los 15 serotipos, actualmente identificados. Su utilidad es primordial, ya que identificaría a los animales enfermos agudos y crónicos con la *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Las desventajas son que no discrimina entre los distintos serotipos existentes y el resultado podría ser negativo en animales portadores, ya que el gen ApxIV solo se expresa en animales que presentan el cuadro clínico (Ferri, 2017).

ELISA dirigidos contra ApxII y ApxIII han mostrado reacciones positivas en cerdos que eran libres de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, debido a una interacción cruzada con otras especies de *Actinobacillus spp*, como *A. suis*, *A. rossi* y *A. porcintoncillarum*. Así el atractivo proporcionado por estas exotoxinas, en la detección vía ELISA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* es un tanto decepcionante (Ferri, 2017).

Otro aspecto importante es que la PCP no solo se puede diagnosticar por medio de la búsqueda de anticuerpos creados contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* o sus propios antígenos. También existe la posibilidad de conjugar los test ya existentes, con la detección de proteínas que exprese el animal, cuando el equilibrio entre el sistema inmunológico y la microbiota respiratoria se vean alterados. Así lo evidenció un estudio llevado a cabo por Henning en 2004, que utilizó un ELISA para detectar péptidos antimicrobianos, producidos por animales enfermos agudos, crónicos, subclínicos y portadores. La determinación de esta proteína descubierta (PR-39) podría crear las bases de una nueva herramienta diagnóstica para identificar a los animales sanos portados del patógeno (Rodríguez, 2012).

Para finalizar, existen otras técnicas que se han probado para la detección de anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*. No obstante, todas presentan la desventaja de las reacciones cruzadas entre serotipos o bacterias relacionadas filogenéticamente. Entre ellas se encuentran las siguientes:

3.5.2.4.-Precipitación en gel o inmunodifusión.

Se basa en la difusión de los antígenos y anticuerpos en un gel de agar, con la consiguiente precipitación de una línea cuando ambos forman complejos inmunes, como se observa en la Imagen 21, donde se esquematizan las reacciones que se pueden presentar. Esta técnica se realiza en placas de agar en donde se practican pocillos, en uno de estos pozos se coloca el suero o muestras a investigar y en el resto se coloca el anticuerpo preparado frente a la sustancia que se quiere identificar. Cuando difunden, ambos sistemas se encontrarán y se formará en la zona de equivalencia el complejo Ag-Ac correspondiente que se hace visible en forma de una línea de precipitación. En una preparación que contenga varios antígenos, se obtendrán múltiples líneas de precipitado, lo que permite identificar sustancias según la forma de unirse las líneas de precipitación de dos o varios sistemas. El inconveniente es su lentitud y la difícil interpretación de las bandas de precipitación (Dennis, 2015).

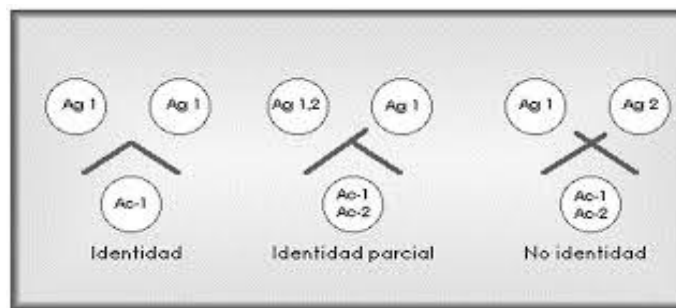


Imagen 21.- Inmunodifusión (Calderón, 2007).

3.5.2.5.-Hemaglutinación indirecta (HAI).

La técnica consiste en la suspensión de las células bacterianas en solución salina durante 12 horas, la cual es centrifugada y, posteriormente, se recoge el sobrenadante. Este extracto salino se incuba una hora en presencia de glóbulos rojos de oveja, de tal forma que los antígenos bacterianos se adsorban a la superficie de los eritrocitos. Finalmente, se tapizan las placas de microtitulación con la suspensión de eritrocitos y se añaden diluciones seriadas del suero problema. Las reacciones positivas se manifiestan como un sedimento plano y las negativas como una mancha abotonada en el centro del pocillo, como se observa en la Imagen 22, donde se esquematiza la técnica de Hemaglutinación indirecta. Se ha demostrado que existen reacciones cruzadas, por ejemplo, con *H. parasuis* (Gottschalk, 2012).

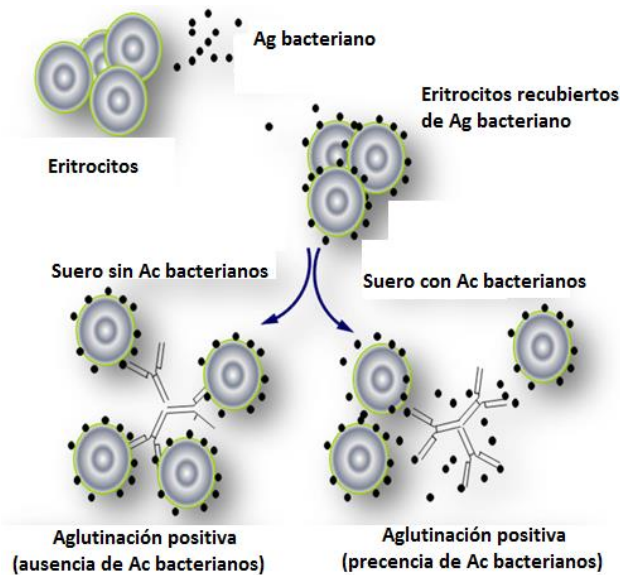


Imagen 22.- Hemaglutinación indirecta (HAI) (Calderón, 2007).

Por lo tanto, las pruebas serológicas o inmunológicas presentan reacciones cruzadas, y aunque estos inconvenientes pueden ser superados por las técnicas moleculares, aún son costosas y no aptas para usarlas rutinariamente por los veterinarios de campo. Otro gran problema es la detección de animales enfermos subclínicos o portadores, en donde las técnicas moleculares podrían ser la gran solución. Además, es importante señalar que estas técnicas, por lo general, son especies específicas, dificultando el diagnóstico de los diferentes serotipos en un país. Por lo tanto, es fundamental, a corto plazo, cultivar y aislar el o los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, después verificar la especie y el serotipo al través de técnicas moleculares y serológicas, para finalmente realizar estudios epidemiológicos que permitan conocer la realidad nacional. Lo anterior con el objetivo de estandarizar la mejor técnica que permite detectar animales portadores, antes de su ingreso a las naves de cerdos, controlando así una enfermedad que ha generado por mucho tiempo considerables pérdidas (Dennis, 2015).

3.5.3.-Técnicas de Biología Molecular.

3.5.3.1.-Hibridación fluorescente *in situ* (FISH).

Es una técnica que utiliza moléculas fluorescentes para localizar genes o fragmentos de DNA. Es especialmente útil para mapear genes o localizar anomalías cromosómicas, como se observa en la imagen 23, donde se esquematiza la técnica de FISH. La técnica consiste en preparar cortas secuencias de DNA de una sola hebra, llamadas sondas, que son complementarias de las secuencias de DNA que se quieren marcar y examinar. Estas sondas se marcan con moléculas fluorescentes. Estas sondas se hibridan o unen al DNA complementario y, como están marcadas con moléculas fluorescentes, permiten localizar las secuencias en las que se encuentran (Dennis, 2015).

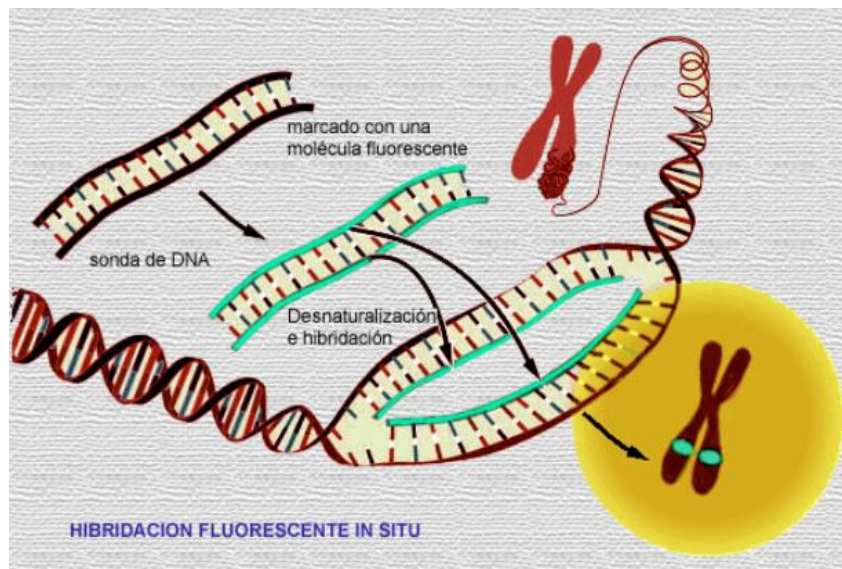


Imagen 23.- Hibridación fluorescente in situ (FISH) (Calderón, 2007). Las moléculas fluorescentes como la **biotina**, también llamada vitamina B7, vitamina H y coenzima R, es una coenzima necesaria para el metabolismo de las grasas, las proteínas y los carbohidratos y la fluoresceína es un colorante sólido de color amarillo que se disuelve en solución alcalina produciendo intensa fluorescencia verde; necesarias para visualizar las secuencias del DNA.

Para FISH se requiere trozos de tejido que son sometidos a una digestión del DNA bacteriano, amplificación y visualización al microscopio. Se desarrolló la hibridación in situ para la detección del gen ApxIV, a través de sondas de DNA marcadas con digoxigenina, que reconocían al gen, desde pulmones de cerdos inoculados experimentalmente. Ésta demostró ser una herramienta valiosa en el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina, cuando solo se utilizan tejidos fijados en formalina como muestras para diagnóstico. Lo que es una ventaja para otro tipo de muestra (Gottschalk, 2012).

3.5.3.2.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR constituye uno de los avances más importantes de la Biomedicina. Esta técnica permite amplificar pequeñas cantidades de DNA entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. Es una reacción que utiliza DNA, enzima polimerasa y oligonucleótidos (primers) para amplificar fragmentos específicos del DNA, consta de tres pasos fundamentales: desnaturalización, alineamiento y extensión, como se observa en la imagen 24, donde se esquematiza la técnica de PCR.

La primera reacción consiste en la *desnaturalización del DNA*, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos; sin embargo, temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G + C. La segunda reacción consiste en la *hibridación de los primers*. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas. La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers son de 50-60°C, aunque también dependen de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores. Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la T_m de los primers.

La tercera reacción es la *extensión*, se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura.

Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo permite obtener millones de copias del fragmento de interés. El número óptimo de ciclos dependerá principalmente de la concentración inicial del templado cuando los otros parámetros son optimizados (Cortázar, 2004).

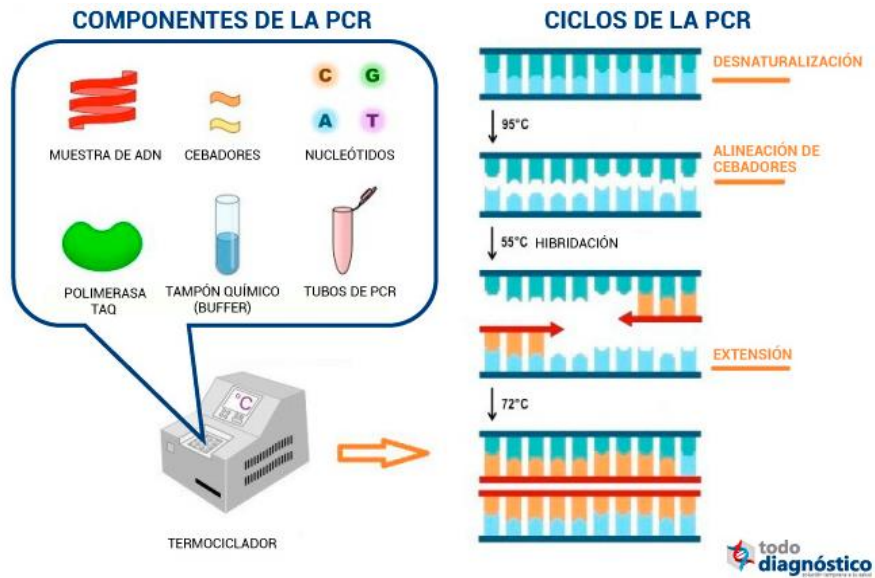


Imagen 24.- Pasos fundamentales en la Técnica de PCR: Desnaturalización, Alineamiento y Extensión (Cortázar, 2004).

Esta herramienta genética es utilizada para identificar *Actinobacillus pleuropneumoniae*, desde de un cultivo mixto de bacterias provenientes de muestras de tonsilas y de tejidos necróticos, genera la ventaja de poder diferenciar entre *Actinobacillus pleuropneumoniae* y otras bacterias como *A. porcino tonsillarum* (Gottschalk, 2012).

En algunos casos, utilizaron PCR para detectar *Actinobacillus pleuropneumoniae*, de ambos biotipos en cerdos portadores o subclínicos en muestras de tejidos (biopsias), tonsilas completas y desde cultivos directos (Dennis, 2015).

4.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el aparato respiratorio del cerdo (pulmón y tonsilas) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para utilizarla como una prueba diagnóstica viable en el estudio de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

4.1.-Objetivos particulares.

- Obtener de la biomasa de los serotipos 1 y 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
- Estandarizar la técnica de extracción de DNA bacteriano correspondiente a los serotipos 1 y 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, mediante la utilización del kit Wizard Genomic DNA Purification (PROMEGA).
- Cuantificar de la cantidad mínima necesaria del material genético de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en los serotipos 1 y 5, para apreciar mejor la banda en la lectura de la electroforesis.
- Estandarizar de la técnica de extracción de DNA bacteriano modificado para tejido de pulmón de cerdo, mediante su liofilización y la obtención de mayor concentración del material genético.
- Determinar la pureza y la integridad del DNA, a través de su lectura en el espectrofotómetro para microplacas (EPOCH) y electroforesis.
- Aplicar de la técnica de PCR para amplificar el material genético de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en las muestras de tejido de pulmón de cerdo y en los serotipos 1 y 5 utilizando primers específicos.
- Detectar la presencia del producto de PCR de *Actinobacillus pleuropneumoniae* mediante la técnica de electroforesis horizontal, teniendo como referencia un marcador de pares de bases y los serotipos 1 y 5.

5.- HIPÓTESIS.

Si se realiza la PCR a los pulmones y tonsilas de cerdo con la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina se podrá amplificar el material genético de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, detectarlo mediante una electroforesis horizontal y así evaluar la eficacia de estas técnicas moleculares.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS.

MATERIALES Y EQUIPO:		
Cajas Petri	Termómetro	Liofilizadora
Pipetas	Portaobjetos	EPOCH
Tubos Eppendorff	Asas bacteriológicas	Termociclador
Mechero	Pinzas	Equipo de electroforesis
Espátula	Tubos de centrifuga industrial	Lámpara de luz UV
Tijeras	Crioviales	Balanza digital y de doble platillo
Bisturí	Propipeta	Autoclave
Micropipetas (100uL, 200uL, 1000uL)	Microcentrífuga	Incubadora a 37°C
Gradilla	Centrífuga Industrial	Cámara de Nitrógeno
Vasos de precipitado	Incubadora con agitación	Parrilla eléctrica
Matraces	Incubadora (Baño María)	Refrigeradores y Congeladores

Muestras.

Se colectaron un total de 172 muestras:

- App Serotipo 1 y 5, obtenidas del aislamiento en medio de cultivo selectivo PPLO.
- Macerados de tejido de pulmón y tonsilas, obtenidas de lesiones características de App.
- Macerados Liofilizados de tejido de pulmón y tonsilas, obtenidas de lesiones características de App.
- Tejidos Liofilizados de pulmón, obtenidas de lesiones características de App. Provenientes de distintas granjas y rastros de la zona del bajío; se mantuvieron a 4°C hasta su uso en la extracción de DNA.

7.- METODOLOGÍA.

7.1.- Obtención de Biomasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Serotipos 1 y 5.

Reactivar los crioviales de los serotipos 1 y 5 que fueron preservados en N₂ líquido, colocarlos en un frasco de vidrio con agua tipo II a temperatura ambiente, a partir de éstos sembrar en un agar BHI (masivo) con estría de Cowan (*Staphylococcus aureus*) e incubar 24 horas a 37°C. Observar el satelitismo y realizar tinción de Gram de alguna colonia cercana a la estría y verificar que sean cocobacilos Gram negativos. Posteriormente resembrar por masivo en un agar PPLO + NADH e incubar 24 horas a 37°C, una vez crecidas las colonias cortar 1/3 del agar en trozos grandes y transferirlos a un caldo PPLO + NADH previamente preparado y esterilizado. Incubar en baño María con agitación a 37°C durante 24 horas (observar

turbidez del medio). Transferir el contenido de los matraces a tubos para su centrifugación (20 min. a 5,000 rpm), desechar el sobrenadante y adicionar 5mL de Skim Milk con una pipeta estéril y resuspender en vórtex (Tubo 1). Vertir el contenido del tubo 1 al tubo 2 y homogenizar en vórtex, y así sucesivamente con todos los tubos que se ocuparon en la centrifuga, si sobró algún residuo en los tubos anteriores recuperarlo y adicionarlo al último tubo, a este tubo añadir 10mL de Skim Milk con otra pipeta estéril y mezclar en vórtex.

Con una micropipeta de 1000mL, llenar los crioviales hasta 2/3 partes y etiquetarlos con lápiz. Realizar la comprobación de App. sembrando en un BHI con estría de Cowan (masivo) y congelar a -30°C.

7.2.- Obtención y almacenamiento de control positivo (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, Serotipos 1 y 5).

Sembrar de forma masiva en agar PPLO + NADH, el serotipo obtenido de la biomasa, verter 1mL de PBS estéril con micropipeta y raspar cuidadosamente el agar con espátula; recolectar la suspensión con micropipeta y vaciar en tubo Eppendorf, incubar a 37°C durante 30 minutos y almacenar en congelación hasta su uso. Todos los materiales utilizados tendrán que estar esterilizados para evitar la contaminación de alguna otra bacteria indeseada.

7.3.- Liofilización.

Pesar cajas Petri vacías sin tapa para tejido o viales de vidrio sin tapa para macerado, cortar láminas de tejido de pulmón con grosor de 4mm, en el caso del macerado transferir el macerado al vial de vidrio, pesarlos nuevamente con la muestra a trabajar, sin tapar y dejar en refrigeración durante 24 horas a una temperatura de 4 a 6°C.

Transcurrido el tiempo de refrigeración, sacar las muestras y pesarlas nuevamente, dejar en congelación durante 48 horas a una temperatura de 15 a -20°C y volver a pesar. Encender la liofilizadora y esperar a que llegue a una temperatura de - 15°C y +/-500 mbar, colocar las muestras en la liofilizadora sin tapa, durante 36 a 72 horas (esperando obtener 93% de deshidratación), finalizado el tiempo de liofilización, sacar las cajas y pesarlas e inmediatamente colocar papel parafilm para su conservación.

7.4.- Extracción y purificación del DNA de *Actinobacillus Pleuropneumoniae*.

7.4.1.- De bacteria: Serotipos 1 y 2 obtenidos de Biomasa.

Agitar la muestra 5 segundos, transferir 300µL de la muestra a un tubo Eppendorff de 1.5mL y centrifugar a 14,500xg durante 2 minutos. Decantar el sobrenadante. Añadir 600µL de solución de lisis de núcleos e invertir 4 veces para resuspender las células. Incubar a 80°C durante 5 minutos para lisar las células; posteriormente enfriar a temperatura ambiente, agregar 4µL de solución del RNAsa, homogenizar con micropipeta e invertir el tubo 5 veces e incubar a 37°C durante 30 minutos.

Enfriar la muestra a temperatura ambiente y añadir 200µL de solución de precipitación proteica. Agitar vigorosamente durante 20 segundos para mezclar la solución de precipitación proteica con el lisado celular e incubar la muestra en hielo durante 5 minutos, centrifugar a 14,500xg durante 3 minutos, transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo limpio Eppendorf de 1.5mL que contiene 600µL de isopropanol a temperatura ambiente y mezclar por inversión suavemente hasta que se formen las hebras de DNA, centrifugar a 14,500xg durante 2 minutos.

Decantar el sobrenadante y añadir 600µL de etanol al 70% a temperatura ambiente e invertir suavemente el tubo varias veces para lavar el pellet de DNA, centrifugar a 14,500xg durante 2 minutos y decantar el sobrenadante cuidadosamente, dejar secar el pellet durante 5 minutos, añadir 100µL de solución de rehidratación de DNA al tubo y rehidratar el DNA a través de las siguientes alternativas:

- Incubar a 65°C durante 1 hora, mezclando periódicamente la solución.
- Incubar la solución a 4°C durante 12hrs.

Almacenar el DNA a 2 – 8°C.

7.4.2.- De bacteria: Macerados de pulmones y tonsilas.

La muestra se homogeniza durante 5 segundos y se transfiere 300µL de la muestra a un tubo Eppendorf de 1.5mL y centrifugar a 14,500xg durante 2 minutos. Decantar el sobrenadante, añadir 600µL de solución de lisis de núcleos e invertir 4 veces para resuspender las células. Incubar a 80°C durante 5 minutos para lisar las células; posteriormente enfriar a temperatura ambiente y agregar 4µL de solución del RNAsa, homogenizar con micropipeta e invertir el tubo 5 veces. Incubar a 37°C durante 30 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente. Añadir 200µL de solución de precipitación proteica y agitar vigorosamente durante 20 segundos para

mezclar la solución de precipitación proteica con el lisado celular e incubar la muestra en hielo durante 5 minutos. Centrifugar a 14,500xg durante 3 minutos y transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo limpio Eppendorf de 1.5mL que contiene 600µL de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar por inversión suavemente hasta que se formen las hebras de DNA y centrifugar a 14,500xg durante 2 minutos, decantar el sobrenadante y añadir 600µL de etanol al 70% a temperatura ambiente e invierta suavemente el tubo varias veces para lavar el pellet de DNA. Centrifugar a 14,500xg durante 2 minutos. Decantar el sobrenadante cuidadosamente. Escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio y dejar secar el pellet durante 5 minutos. Añadir 100µL de solución de rehidratación de DNA al tubo y llevar a cabo una de las siguientes alternativas:

- Incubar a 65°C durante 1 hora, mezclando periódicamente la solución.
- Incubar la solución a 4°C durante 12hrs.

Finalmente se almacena el DNA a 2 – 8°C.

7.4.3.- De tejido: Liofilizado de macerado.

Colocar una porción aprox. 1g de tejido liofilizado de pulmón de cerdo en un tubo Eppendorf de 1,5mL y añadir 600µL de solución de lisis de núcleos. Para resuspender las células, se agita durante 5 segundos. Incubar a 65°C durante 30 minutos para lisar las células; posteriormente enfriar a temperatura ambiente. Agregar 4µL de solución del RNAsa y homogenizar con micropipeta e invertir el tubo 5 veces. Incubar a 37°C durante 30 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente y añadir 200µL de solución de precipitación proteica. Mezclar la solución de precipitación proteica con el lisado celular agitándolo vigorosamente durante 20 segundos e incubar la muestra en hielo durante 5 minutos. Centrifugar a 14,500xg durante 4 minutos. Transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo limpio Eppendorf de 1.5mL que contiene 600µL de isopropanol a temperatura ambiente y mezclar por inversión suavemente hasta que se formen las hebras de DNA. Centrifugar a 14,500xg durante 1 minutos, decantar el sobrenadante. Añadir 600µL de etanol al 70% a temperatura ambiente e invierta suavemente el tubo varias veces para lavar el pellet de DNA. Centrifugar a 14,500xg durante 1 minutos. Decantar el sobrenadante cuidadosamente. Invertir el tubo sobre papel absorbente limpio para eliminar material líquido, dejar secar el pellet durante 5 minutos y añadir 100µL de solución de rehidratación de DNA al tubo, posteriormente se pueden seguir alguna de estas alternativas:

- Incubar a 65°C durante 1 hora, mezclando periódicamente la solución.
- Incubar la solución a 4°C durante 12hrs.

Por último, se almacena el DNA a 2 – 8°C.

7.4.4.- De tejido: Liofilizado de tejido.

Colocar una porción aprox. 1g de tejido liofilizado de pulmón de cerdo en un tubo Eppendorf de 1,5mL y añadir 600µL de solución de lisis de núcleos. Agitar 5 segundos para resuspender las células e incubar a 65°C durante 30 minutos para lisar las células; posteriormente enfriar a temperatura ambiente. Agregar 4µL de solución del RNAsa, homogenizar con micropipeta, invertir el tubo 5 veces e incubar a 37°C durante 30 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente. Añadir 200µL de solución de precipitación proteica. Mezclar la solución de precipitación proteica con el lisado celular mediante agitación vigorosa durante 20 segundos e incubar la muestra en hielo durante 5 minutos. Centrifugar a 14,500xg durante 4 minutos y transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo limpio Eppendorf de 1.5 mL que contiene 600µL de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar por inversión suavemente hasta que se formen las hebras de DNA. Centrifugar a 14,500xg durante 1 minutos y decantar el sobrenadante. Añadir 600µL de etanol al 70% a temperatura ambiente e invierta suavemente el tubo varias veces para lavar el pellet de DNA. Centrifugar a 14,500xg durante 1 minutos. Decantar el sobrenadante cuidadosamente. Escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio y dejar secar el pellet durante 5 minutos y añadir 100µL de solución de rehidratación de DNA al tubo y rehidratar el DNA a través de las siguientes alternativas:

- Incubar a 65°C durante 1 hora, mezclando periódicamente la solución.
- Incubar la solución a 4°C durante 12hrs.

Al término, almacenar el DNA a 2 – 8°C.

7.5.- Evaluación de la Calidad del DNA

7.5.1.- Lectura de la pureza del DNA utilizando el Espectrofotómetro para microplacas (EPOCH).

Centrifugar las muestras durante 10 segundos, cargar cada celda con 2µL por muestra, sin formar burbujas: Ocupar los dos primeros pocillos para los blancos con solución de rehidratación para DNA, posteriormente ocupar el resto de los pocillos para las muestras obtenidas de la Extracción de DNA.

Comenzar las lecturas en el Espectrofotómetro registrándose en el programa Gen 5 EPOCH: Iniciar por los blancos confirmando que sean viables, posteriormente continuar con la lectura de las muestras.

7.5.2.- Lectura de la Integridad del DNA mediante Electroforesis en gel de Agarosa al 1.2%.

Pesar 0.65g de Agar Agarosa y añadir a 50mL de TAE 1X, calentar y agitar hasta clarificar. Preparación de cámara de Electroforesis (Gomas y peine). Vertir el agar líquido en la cámara de Electroforesis y enfriar con Refrigerante. Esperar a que gelifique. Conservar en recipiente limpio y estéril con Buffer TAE 1X en refrigeración hasta su uso.

Electroforesis horizontal en gel agarosa al 1.2%: Montar la cámara de Electroforesis, colocar el gel de agarosa y cubrirlo con el Buffer TAE 1X. Mezclar los siguientes reactivos hasta obtener una solución homogénea.

Colocar en cada uno de los pocillos del gel agarosa:

REACTIVO	CANTIDAD
Buffer de carga	1 μ L
+	+
Muestra	7 μ L

Cerrar, conectar y encender la cámara de Electroforesis. Ajustar a 110-115volts y en voltaje constante durante aproximadamente 45 minutos. Al término, disminuir a 0volts, apagar y desconectar el equipo. Sacar con cuidado el gel y colocarlo en la lámpara de luz UV. Utilizar los lentes de protección para poder observar las bandas formadas.

7.6.- PCR de punto final.

Utilizando el kit para PCR “Wizard Genomic DNA Purification kit, Promega” Número de catálogo A1120 y Termociclador Techne Progene FPR0G02Y. Esperando obtener un fragmento de elongación de 417pb-418pb, como se observa en el Cuadro 8, donde se muestra la secuencia de los primers utilizados en la PCR para *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Añadir en un tubo Eppendorf estéril los siguientes reactivos respetando el orden y en frío:

REACTIVOS	PARA 1 REACCIÓN
PCR Master Mix MgCl ₂	25µL
Apx1 [50µM]	5µL
Apx3 [50µM]	5µL
H ₂ O PCR	12µL
TOTAL: Preparado para PCR	47µL

NOTA #1: Cada vez que se adicione un reactivo, se debe introducir la micropipeta hasta el fondo del tubo, mezclándolo cuidadosamente para no generar burbujas.

NOTA #2: El cálculo se realiza para el número de muestras a procesar (número de reacciones), además de contemplar un excedente para evitar que falte reactivo, es decir, si se quieren procesar 5 muestras, los cálculos se harían para 5.5 reacciones y se llevarían a cabo todas en un mismo tubo Eppendorff.

Añadir en tubos mini Eppendorf estériles para PCR, los siguientes reactivos respetando el orden y en frío:

REACTIVOS	PARA 1 REACCIÓN
Preparado para PCR	47µL
Muestra (DNA)	3µL
TOTAL	50µL

NOTA #3: Cada vez que se adicione un reactivo, se debe introducir la micropipeta hasta el fondo del tubo, mezclándolo cuidadosamente para no generar burbujas.

NOTA #4: La cantidad de tubos para PCR será igual al número de muestras procesadas.

NOTA #5: El Preparado para PCR contiene Master Mix MgCl₂, Apx1 [50µM], Apx3 [50µM] y H₂O PCR.

Una vez que se tiene todos los tubos de PCR listos se colocan en el termociclador de acuerdo a las condiciones escritas en el Cuadro 8. La reacción dura aproximadamente 2 horas con 45 minutos. Finalizado el tiempo de la reacción, se sacan los tubos y se conservan a una temperatura de -15 a -20°C.

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

Cuadro 8. Secuencia de los primers utilizados en la PCR para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Janine, 2011).

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

7.7.- Caracterización del producto de PCR por electroforesis horizontal.

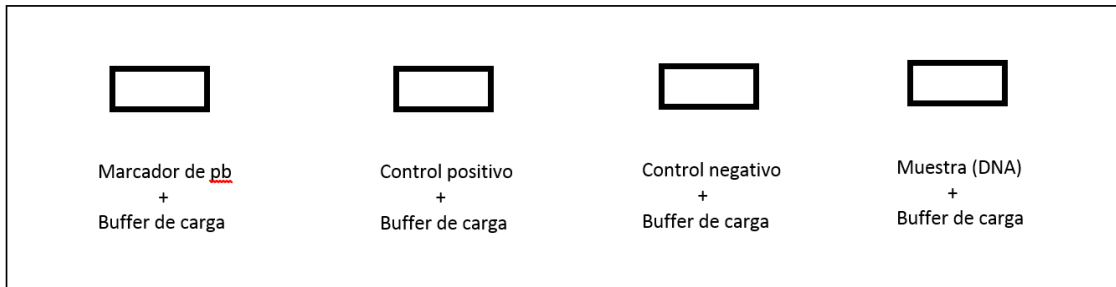
Electroforesis horizontal en gel agarosa al 1.2% (fuente de poder para electroforesis CONSORT 1200V-500mA E815)

Montar la cámara de Electroforesis, colocar el gel de agarosa al 1.2% y cubrirlo con el Buffer TAE 1X. Mezclar los siguientes reactivos hasta obtener una solución homogénea.

Colocar la solución en los pocillos del gel agarosa, tal como se muestra a continuación:

POCILLO	REACTIVO	CANTIDAD
1	Buffer de carga + Marcador de pb*	1 μ L + 4 μ L
2	Buffer de carga + Control + (ST1 o ST5)	1 μ L + 7 μ L
3	Buffer de carga + Control – (Sol. de rehidratación)	1 μ L + 7 μ L
4	Buffer de carga + Muestra	1 μ L + 7 μ L

*Marcador de peso molecular HyperLadder® 100pb



Cerrar, conectar y encender la cámara de Electroforesis. Ajustar a 110-115volts y en voltaje constante durante aproximadamente 45 minutos. Al término, disminuir los volts a 0, apagar y desconectar el equipo. Desmontar con cuidado el gel y colocarlo en la lámpara de luz UV. Utilizar los lentes de protección para poder observar las bandas formadas.

8.- RESULTADOS.

En el Cuadro 9, se muestra el lote de 16 muestras almacenadas como macerados de órganos de pulmón y tonsila, proveniente de granja y rastro, que fueron procesadas mediante PCR sin lectura previa de pureza e integridad.

No.	Muestra	Granja (G)/ Rastro (R)	Técnica
1	13P	G	Macerado
2	14P	G	Macerado
3	12P1	G	Macerado
4	11T	G	Macerado
5	9T1	R	Macerado
6	8T1	R	Macerado
7	7T1	R	Macerado
8	10T	G	Macerado
9	33M	G	Macerado
10	31M	G	Macerado
11	19T1	G	Macerado
12	18T	G	Macerado
13	17T	G	Macerado
14	16M	G	Macerado
15	15M	G	Macerado
16	38M	G	Macerado

Cuadro 9. Muestras procesadas mediante PCR sin lectura de pureza e integridad.

P: Pulmón T: Tonsila M: Macerado

En el Cuadro 10, se muestra el lote de 14 muestras de macerados de pulmón y tonsila provenientes de granja y rastro, a las que se les realizó PCR teniendo con antelación la lectura de pureza y cantidad de DNA en la muestra mediante el EPOCH, antes de la curva de serotipos.

No.	Muestra	Granja (G)/ Rastro (R)	Técnica	A260/A280 (λ)	ng/ μ L
1	8P1	R	Macerado	1.902	121.476
2	9P1	R	Macerado	2.082	56.772
3	10T1	R	Macerado	1.634	11.873
4	11T1	R	Macerado	1.436	8.046
5	7P1	G	Macerado	1.709	5.797
6	13P	G	Macerado	1.126	67.301
7	15P1	R	Macerado	1.536	8.593
8	29T2	R	Macerado	1.576	5.317
9	14T1	R	Macerado	1.584	23.032
10	12P1	G	Macerado	1.85	62.119
11	11P1	G	Macerado	1.534	34.111
12	14P1	G	Macerado	1.41	128.32
13	16T1	R	Macerado	1.702	7.237
14	17P1	R	Macerado	1.764	45.063

Cuadro 10. Muestras con lectura de pureza antes de la curva de serotipos.

P: Pulmón T: Tonsila

En el Cuadro 11, se muestran los valores de la relación 260/280 y cantidad de DNA presente en los serotipos 1 y 5, obtenidos mediante la utilización del Espectrofotómetro para microplacas (EPOCH).

SEROTIPO	A260/A280 (λ)	ng/ μ L
5	1.971	209.325
1	1.794	491.916

Cuadro 11. Lectura del EPOCH correspondiente a los serotipos 1 y 5.

En el Cuadro 12, se muestran los valores obtenidos de la lectura en el EPOCH de los ng presentes de material genético por cada microlitro de la muestra para obtener el límite de detección de DNA de *App* correspondiente al serotipo 1.

μ L	ng
1	4.9191
2	9.8383
3	14.7574
4	19.6766
5	24.5958
6	29.5149
7	34.4341

Cuadro 12. Límite de detección de DNA de *App* para el serotipo 1.

En el Cuadro 13, se muestran los valores obtenidos de la lectura en el EPOCH de los ng presentes de material genético por cada microlitro de la muestra para obtener el límite de detección de DNA de *App* correspondiente al serotipo 5.

μ L	ng
1	2.0932
2	4.1865
3	6.2797
4	8.373
5	10.4662
6	12.55
7	14.6527

Cuadro 13. Límite de detección de DNA de *App* para el serotipo 5.

En el Cuadro 14, se muestran los valores obtenidos en un lote de 108 muestras de macerado descartadas, debido a que NO cumplen con el parámetro óptimo de la relación A260/A280 (λ) o con la concentración de DNA necesaria (400ng/100 μ L) para procesarla mediante PCR.

No.	Muestra	Granja (G) / Rastro (R)	Técnica	A260/A280(λ)	ng/100 μ L
1	7T	G	Macerado	2,069	216,786
2	15T1	R	Macerado	1.606	22.967
3	13P1	R	Macerado	1.608	183.675
4	29P1	R	Macerado	1.117	3.412
5	30P1	R	Macerado	2.096	63.693

6	16P1	R	Macerado	1.386	30.317
7	13T1	R	Macerado	2.264	109.41
8	12T1	R	Macerado	1.503	23.924
9	14P1	R	Macerado	1.969	53.817
10	30T1	R	Macerado	2.599	148.321
11	17T1	R	Macerado	2.275	95.79
12	28T1	R	Macerado	0.727	6.529
13	28P1	R	Macerado	2.4	6.115
14	10P1	R	Macerado	1.897	45.121
15	18P1	R	Macerado	1.852	7.699
16	18T1	R	Macerado	1.622	9.202
17	18P2	R	Macerado	1.51	11.902
18	31P2	R	Macerado	1.811	14.643
19	31T1	R	Macerado	1.155	5.713
20	32P1	R	Macerado	1.787	12.841
21	32T1	R	Macerado	1.095	15.863
22	33P1	R	Macerado	1.719	4.983
23	33T1	R	Macerado	1.575	30.377
24	12T	R	Macerado	1.392	16.7
25	21P2	G	Macerado	1.802	111.021
26	21T2	G	Macerado	1.451	38.139
27	10 ¹ #2	G	Macerado/dilución	1.954	39.166
28	10 ¹ #3	G	Macerado/dilución	1.624	56.64
29	22T1	G	Macerado	1.75	24.995
30	10 ¹ #4	G	Macerado/dilución	1.906	24.868
31	24P1	G	Macerado	1.828	95.892
32	25P1	G	Macerado	1.627	52.776
33	24T1	G	Macerado	1.301	137.91
34	25T1	G	Macerado	2.016	12.854
35	10 ¹ #1	G	Macerado/dilución	1.829	7.559
36	22P2	G	Macerado	1.949	147.19
37	23P1	G	Macerado	1.918	32.093
38	23T2	G	Macerado	2.639	4.815
39	38P2	G	Macerado	1.924	106.909
40	10 ² #3	G	Macerado/dilución	1.721	16.718
41	10 ² #4	G	Macerado/dilución	1.669	12.564
42	10 ² #2	G	Macerado/dilución	1.859	60.86
43	10 ² #1	G	Macerado/dilución	1.365	5.152
44	26P1	R	Macerado	1.875	80.079
45	30P2	G	Macerado	1.842	45.312
46	5P1	G	Macerado	1.18	8.947
47	1P	G	Macerado	1.687	33.316
48	2P	G	Macerado	1.843	6.57
49	3P	G	Macerado	2.108	104.958
50	4T	G	Macerado	1.953	27.352
51	5T	G	Macerado	2.222	25.992
52	6T	G	Macerado	2.019	37.574
53	19T	G	Macerado	1.121	3.336
54	20T	G	Macerado	1.636	11.708
55	15P	G	Macerado	2.096	47.965
56	16P	G	Macerado	2.469	4.017
57	17P	G	Macerado	1.638	46.977
58	18P	G	Macerado	1.956	125.314
59	19P	G	Macerado	1.722	114.96
60	20P	G	Macerado	1.632	125.67
61	20T	G	Macerado	1.821	57.802

62	21P	G	Macerado	2.151	78.157
63	22P	G	Macerado	1.597	5.252
64	1T	G	Macerado	1.683	61.122
65	2T	G	Macerado	1.537	35.729
66	3T	G	Macerado	1.739	117.82
67	4T	G	Macerado	1.642	145.33
68	23P	G	Macerado	2.047	88.732
69	24P	G	Macerado	1.911	42.802
70	25P	G	Macerado	2.107	61.903
71	26P	G	Macerado	1.599	127.25
72	27P	G	Macerado	1.755	79.993
73	28P	G	Macerado	1.952	63.298
74	1P	G	Macerado	1.792	66.121
75	2T	G	Macerado	1.631	25.71
76	2P	G	Macerado	1.809	7.892
77	3P	G	Macerado	1.719	15.512
78	3.1P	G	Macerado	1.912	81.127
79	4P	G	Macerado	2.176	111.92
80	4T	G	Macerado	1.669	36.412
81	5P	G	Macerado	2.204	21.035
82	5T	G	Macerado	1.52	128.329
83	6P	G	Macerado	1.913	32.532
84	8P	G	Macerado	1.611	94.175
85	9T	G	Macerado	1.993	23.702
86	10P	G	Macerado	1.897	93.63
87	11T	G	Macerado	1.927	75.103
88	13T	G	Macerado	1.357	22.059
89	9P	G	Macerado	2.335	65.241
90	D2G	G	Macerado	1.849	20.247
91	D2T	G	Macerado	1.642	86.059
92	D2P	G	Macerado	1.871	96.84
93	D4G	G	Macerado	2.059	36.241
94	D4T	G	Macerado	1.903	43.081
95	D4P	G	Macerado	1.61	87.21
96	E5G	G	Macerado	1.514	46.051
97	E5T	G	Macerado	1.138	23.114
98	17M	G	Macerado	1.973	13.454
99	23M	G	Macerado	1.914	118.173
100	26M	G	Macerado	1.928	59.723
101	32M	G	Macerado	1.634	10.453
102	34M	G	Macerado	1.86	10.659
103	35M	G	Macerado	1.333	59.163
104	36M	G	Macerado	1.51	87.089
105	37M	G	Macerado	1.88	52.07
106	39M	G	Macerado	1.326	35.179
107	E5P	G	Macerado	1.509	61.755
108	12P2/2A	G	Macerado	1.946	118.365

Cuadro 14. Muestras descartadas debido a que NO cumplen con la relación 260/280 o con la concentración de DNA esperada.

P: Pulmón **T:** Tonsila **M:** Macerado

En el Cuadro 15, se muestran los valores obtenidos en un lote de muestras de macerado que cumplen con el parámetro óptimo de la relación A260/A280(λ) y la concentración de DNA necesaria (400ng/100 μ L) para procesarla mediante PCR.

No.	Muestra	Granja (G) / Rastro (R)	Técnica	A260/A280(λ)	ng/100 μ L
1	29P1	G	Macerado	1.85	1385.06
2	35P2	G	Macerado	1.94	1539.81
3	D4P2	G	Macerado	1.921	678.744
4	40M	G	Macerado	1.86	3061.21
5	40M'	G	Macerado	1.736	3235.28
6	11P2/1A	G	Macerado	1.787	700.325

Cuadro 15. Muestras que si cumplen con la pureza esperada y se les realizó PCR debido a la buena cantidad de ng de DNA que presentan.

P: Pulmón M: Macerado

En el Cuadro 16, se muestran los valores obtenidos en un lote de 7 muestras de macerado, a las que se le realizó PCR a pesar de no cumplir con el parámetro óptimo de la relación A260/A280(λ) y/o con la cantidad de DNA necesaria (400ng/100 μ L).

No.	Muestra	Granja (G) / Rastro (R)	Técnica	A260/A280(λ)	ng/100 μ L
1	20P1	G	Macerado	1.897	339.047
2	36P2	G	Macerado	1.943	336.476
3	6T2	G	Macerado	1.913	297.437
4	12P1	R	Macerado	1.805	265.355
5	11P1	R	Macerado	1.795	316.296
6	9T	G	Macerado	2,104	242,455
7	7P1	R	Macerado	1.443	225.108

Cuadro 16. Muestras que no cumplen con la pureza y/o cantidad necesaria de DNA necesaria pero que se les realizó PCR.

P: Pulmón T: Tonsila M: Macerado

En el cuadro 17 se muestran los valores obtenidos de 5 muestras elegidas al azar para aumentar su concentración por medio de la liofilización, en las cuales se obtuvo una gran cantidad de DNA.

No.	Muestra	Granja (G) / Rastro (R)	Técnica	A260/A280(λ)	ng/100 μ L
1	20P2/3A	G	Macerado Liofilizado	1.912	1729.75
2	24T1/6A	G	Macerado Liofilizado	1.693	597.47
3	35PIV	G	Macerado Liofilizado	1.676	1231.51
4	36PIV	G	Macerado Liofilizado	1.867	464.719
5	14P1	G	Macerado Liofilizado	1.919	2261.99

Cuadro 17. Muestras que cumplen con los ng requeridos de DNA para la realización de PCR.

P: Pulmón T: Tonsila

NOTA: En estas muestras no se tomó en cuenta la relación A260/A280

En el Cuadro 18, se muestran los valores obtenidos en un lote de 14 muestras de macerado, macerado liofilizado y órganos liofilizados que cumplen con los

parámetros de la relación A260/A280(λ) y de ng requeridos de DNA (400ng/100 μ L) para su procesamiento mediante la técnica de PCR.

No.	Muestra	Granja (G) / Rastro (R)	Técnica	A260/A280(λ)	ng/100 μ L
1	1M	G	Liofilizado de órgano	1.847	1453.12
2	2M	G	Liofilizado de órgano	1.86	455.897
3	3M	G	Liofilizado de órgano	1.852	643.4
4	4M	G	Liofilizado de órgano	1.863	591.002
5	5M	G	Liofilizado de órgano	1.896	730.214
6	1PLB	G	Liofilizado de órgano	1.917	2317.06
7	2PLB	G	Liofilizado de órgano	1.928	2584.84
8	3PLB	G	Liofilizado de órgano	1.91	2676.39
9	5TLB	G	Liofilizado de órgano	1.845	2834.79
10	4TLB	G	Liofilizado de órgano	1.826	1801
11	1inv	G	Liofilizado de órgano	1.797	869.937
12	2inv	G	Liofilizado de órgano	1.782	1204.81
13	3inv	G	Liofilizado de órgano	1.748	959.579
14	4inv	G	Liofilizado de órgano	1.86	1173.23
15	5inv	G	Liofilizado de órgano	1.805	2633.085

Cuadro 18. Muestras que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR.

En la Imagen 25, se observa el corrimiento de las muestras a lo largo de los carriles 1-6 lo que impide tener una buena lectura ya que no hay presencia de bandas definidas.



Imagen 25.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de las muestras procesadas mediante PCR sin lectura de pureza e integridad (17T, 18T, 19T, 31M, 33M, 10T).

En la Imagen 26, se señalan las bandas definidas de los st.1 y st.5 (controles positivos) correspondientes a *App* (carril 2 y 3), esto se define al compararlas con el Mpb específico para la bacteria (carril 1). También se puede observar el control negativo (carril 4). Por otro lado, no se aprecia la presencia de bandas ni de corrimiento de las muestras a lo largo de los carriles 5-8, esto podría deberse a que no hay material genético o que éste es muy poco, lo que lo hace imperceptible.

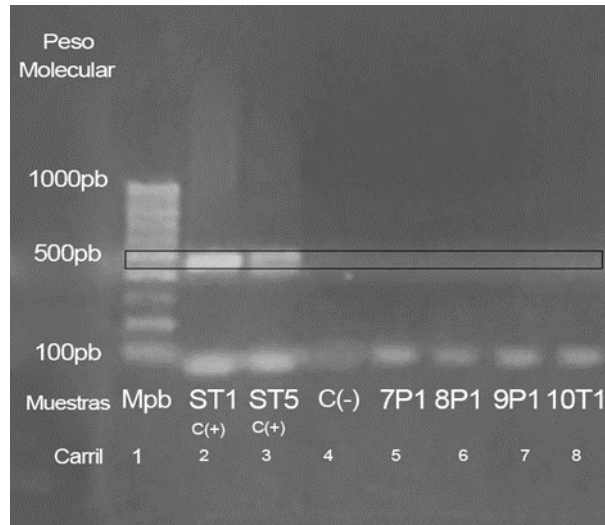


Imagen 26.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras con lectura de pureza antes de la curva de serotipos (7P1, 8P1, 9P1,10T1).

En la Imagen 27, se observa el st.1 de *App* a diferentes concentraciones por lo que se pueden detectar bandas de distinta intensidad, comparándolas con el Mpb (carril 1). En los carriles 2 y 3 las bandas son más intensas, en comparación a los carriles 4 y 5 donde son más tenues, finalmente en los carriles 6 y 7 no se logra apreciar alguna banda, solo el corrimiento de la muestra a lo largo del carril. También se puede observar el control negativo (carril 8). Lo anterior brinda la facilidad de conocer cuánta cantidad de st.1 (control positivo) se utilizaría en las próximas corridas de electroforesis, a fin de que haya una banda de calidad con la cual comparar las muestras. Finalmente, la banda del producto de PCR se señala en el cuadro.

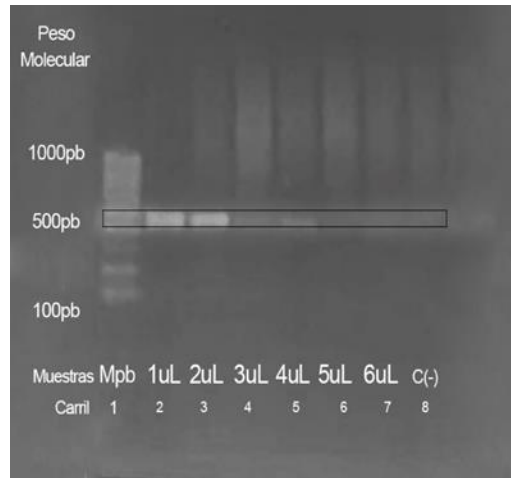


Imagen 27.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de la curva de límite de detección inferior de DNA del st.1 a diferentes cantidades (μ L).

En la Imagen 28, se observa el st.5 de *App* a diferentes concentraciones por lo que se pueden detectar bandas de distinta intensidad, comparándolas con el Mpb (carril 1). En los carriles 3, 4, 6 y 7 las bandas logran ser más intensas que en los carriles 2 y 5 donde la banda es más tenue. También se puede observar el control negativo (carril 8). Con base en esto, se puede saber la cantidad necesaria de st.5 a ocupar en las próximas electroforesis para lograr obtener una banda de buena calidad y poderla comparar con las demás muestras. Por último, la banda del producto de PCR se señala encerrándolo en el cuadro.

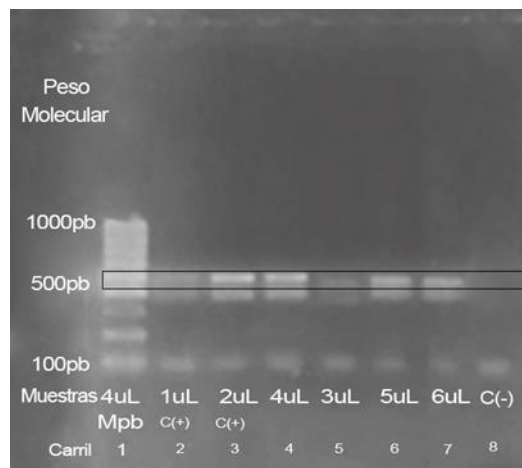


Imagen 28.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de la curva de límite de detección inferior de DNA del st.5 a diferentes cantidades (μ L).

En la Imagen 29, se muestra la electroforesis de un lote de muestras de macerados de pulmón (carriles 4-7), en las cuales no se observa alguna banda asociada con la presencia de *App*, esto comparadas con el st.1 control positivo (carril 2) y con el Mpb (carril1). También se puede observar el control negativo (carril 3). Para finalizar, la banda del producto de PCR se señala en el cuadro.

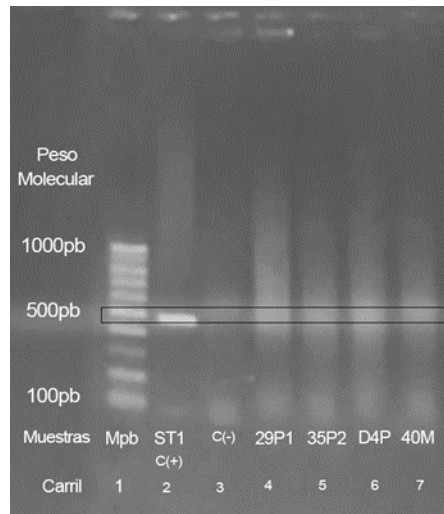


Imagen 29- Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR (29P1, 35P2, D4P2, 40M).

En la imagen 30, se observan muestras que se procesaron por PCR debido a que presentaban una buena cantidad de material genético, aunque no tenían la pureza deseada, esto se comprueba ya que las bandas no se logran apreciar claramente, solo los corrimientos de las muestras (carriles 5-8), esto comparado con los st.1 y st.5 controles positivos (carriles 2 y 3) y con el Mpb (carril 1). También se puede observar el control negativo (carril 4). Finalmente, la banda del producto de PCR se señala en el recuadro.

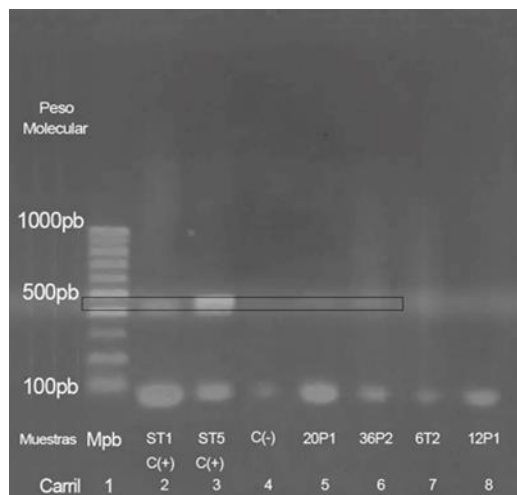


Imagen 30.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras que no tenían una buena pureza, pero con una buena cantidad de DNA (20P1, 36P2, 6T2, 12P1).

En la imagen 31, se aprecia la el st.1 y st.5 controles positivos (carriles 2 y 3) y con el Mpb (carril 1). También se puede observar el control negativo (carril 4); con lo que se puede deducir que no hay presencia de *App* en ellas, solo existe el corrimiento del DNA. Finalmente, la banda del producto de PCR se señala en el recuadro.

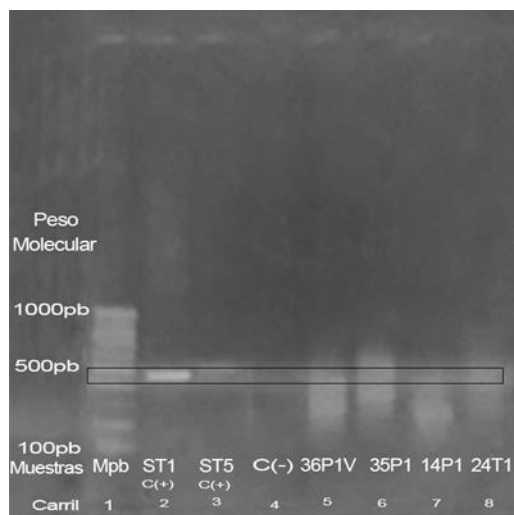


Imagen 31.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR (36P1V, 35P1V, 14P1, 24T1).

En la Imagen 32, se muestra la ausencia de las bandas características de *App* en los carriles 5-8, ya que solo se observa corrimiento de material genético en el carril, esto en comparación con los st.1 y st.5 controles positivos (carriles 2 y 3) y con el Mpb (carril 1). También se puede observar el control negativo (carril 4). Finalmente, la banda del producto de PCR se señala con el recuadro.

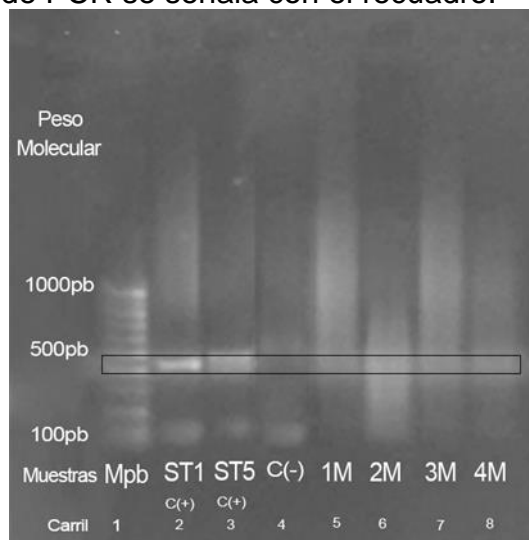


Imagen 32.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras liofilizadas de órgano que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR (1M, 2M, 3M, 4M).

En la Imagen 33, se observa otro lote de muestras en las cuales no se encuentran las bandas asociadas con la presencia de *App*, tal como se puede ver en los carriles 5 y 6 solo existe corrimiento de DNA y en los carriles 7 y 8 el material genético es casi imperceptible. Todo lo anterior es comparando con los st.1 y st.5 controles positivos (carriles 2 y 3) y con el Mpb (carril 1). También se puede observar el control negativo (carril 4). Finalizando con la banda del producto de PCR que se resalta con el cuadro.

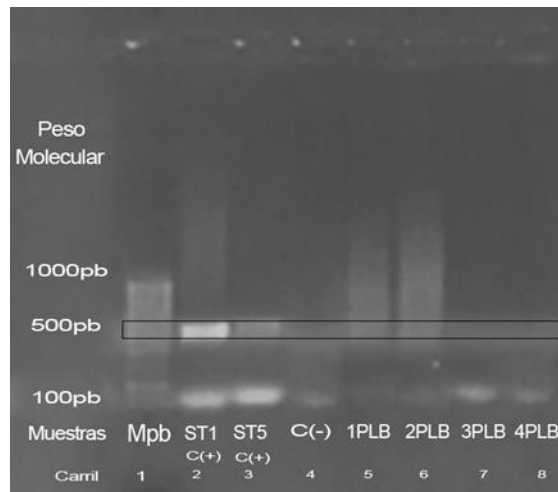


Imagen 33.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras liofilizadas de órgano que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR (1PBL, 2PBL, 3PBL, 4PBL).

En la Imagen 34, se aprecia la corrida de electroforesis de distintas muestras, no se visualiza la presencia de bandas correspondientes a *App*, ya que en los carriles 5-8 está solo el material genético corrido, comparado con los st.1 y st.5 controles positivos (carriles 2 y 3) y con el Mpb (carril 1). También se puede observar el control negativo (carril 4). Finalmente, la banda del producto de PCR se señala en el recuadro.

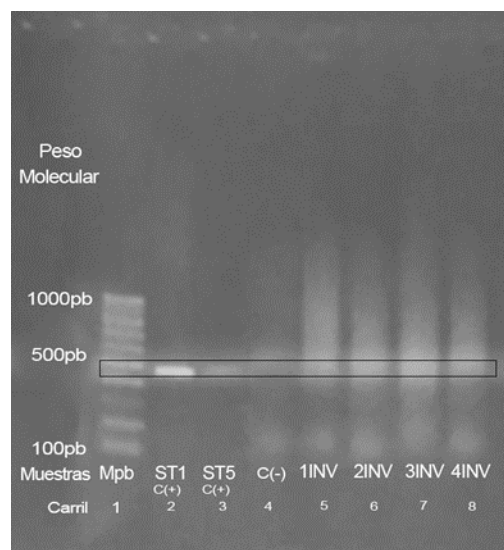


Imagen 34.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras liofilizadas de órgano que cumplen con los parámetros de pureza y ng requeridos de DNA para la realización de PCR (1INV, 2INV, 3INV, 4INV).

9.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

Debido a las grandes concentraciones de los serotipos 1 y 5 de *App* que se necesitaban para trabajar, así como la complejidad de su aislamiento, se decidió realizar una biomasa de los serotipos, para esto se utilizó el medio de cultivo PPLO enriquecido con NAD, los cuales fueron preservados en congelación para su posterior uso.

A las muestras de macerado (véase Cuadro No. 9) se les realizó PCR punto final (técnica basada en la replicación celular, donde actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de DNA a partir de otra que funciona como molde). En la PCR punto final no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco y es necesario que se visualice en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa, proporcionando evidencia cualitativa de la presencia de ese fragmento de ADN en la muestra. Posterior a la extracción de DNA, estas fueron corroboradas mediante una electroforesis horizontal en gel agarosa al 1.5%, en la cual podemos separar fragmentos de DNA y RNA en función de su tamaño y carga eléctrica, observarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza.

Los resultados observados no fueron los esperados ya que las bandas no se observaban, eran muy débiles, borrosas o extendidas (Véase Imagen No. 25); esto se podía deber a la insuficiente cantidad o concentración de DNA en la muestra, desnaturalización del DNA, mala colocación en el pocillo, demasiadas sales o contaminación por proteína, como lo menciona Herráez, A. (2010).

Por lo tanto, se determinó la concentración y la pureza del DNA de las muestras mediante espectrofotometría (véase Cuadro No. 10), que se basa en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. De este modo, la concentración de la muestra de DNA se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260nm, mientras que la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} se utiliza para evaluar la pureza de las muestras. La relación A_{260}/A_{280} es muy estable y se considera que el DNA de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un DNA de pureza aceptable debe tener al menos una relación $A_{260}/A_{280} > 1.6$. Un valor $A_{260}/A_{280} < 1.6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio $A_{260}/A_{280} > 2.1$ podría deberse a la presencia de RNA en la muestra.

En cuanto a la concentración del gel de agarosa, se hicieron modificaciones, ya que la forma más común para separar ácidos nucleicos se encuentra en el rango de 0.5% - 4%, la concentración inicial utilizada fue de 1.5% que corresponde al intervalo de 80pb – 4kb, y fue modificada a 1.2% (150pb – 6 kb) debido a que es más cercano a las pb de *App* (417pb); con estos nuevos parámetros se llevó a cabo nuevamente una PCR y electroforesis.

Al observar que se continuó con errores similares (véase Imagen No. 26).en la electroforesis, se decidió realizar una curva de concentración y límite de detección de DNA de *App* de los serotipos 1 y 5 (véase Cuadro No. 12-13), por lo cual se determinó que la mínima cantidad de DNA debe ser de 4ng/μL con una pureza muy cercana a 1.80 (véase Imagen 27-28), por lo tanto, las muestras que no cumplían con este requerimiento no se consideraron viables y fueron descartadas para la realización de PCR así como electroforesis (véase Cuadro No. 14).

Mientras que las muestras que si cumplieron con los parámetros (véase cuadro No.15), se les realizó PCR, así como electroforesis; con respecto a las muestras que eran muy cercanas a la concentración y pureza deseada (véase cuadro No. 16), también, fueron tomadas en cuenta para la realización de PCR y electroforesis. Sin embargo, los resultados no eran los óptimos (véase Imagen No. 29 y 30), por ende, de las muestras descartadas, se escogieron seis macerados de pulmón al azar (véase cuadro No.17) para aumentar su concentración de DNA mediante el método de liofilización, este proceso tiene como objetivo separar el agua u otro solvente de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida. La liofilización es el proceso más suave para secar productos y es el mejor método para secar compuestos orgánicos o inorgánicos sin alterar su composición cualitativa o cuantitativa. El proceso de liofilización se realiza a vacío y a baja temperatura, de esta forma es posible evitar la desnaturalización de las proteínas. Los alimentos y los materiales biológicos tales como células, tejidos, bacterias y vacunas se convierten en productos secos, evitando el paso por su fase líquida, y en consecuencia los cambios enzimáticos, biológicos y químicos.

Debido a que los resultados seguían sin ser positivos (véase Imagen No.31) se decidió realizar la liofilización directamente del órgano dañado en vez de usar un macerado, obteniendo una mayor pureza y concentración del DNA (véase Cuadro No. 18) por lo tanto, se llevó a cabo la realización de PCR y electroforesis, en donde se puede observar que las muestras son negativas en comparación con el control positivo (véase Imágenes No. 32, 33, 34) donde en este claramente se observa la banda.

De esta manera, se logró deducir que en las muestras recopiladas (macerados, órganos) no hay presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, ya que las condiciones fueron modificadas varias veces y se realizaron otras técnicas complementarias como fue el aislamiento, crecimiento directo de la bacteria en agar y la liofilización para obtener mejores resultados; sin embargo, no fue de esa manera. Por ello, al analizar los factores que pudieron interferir en este experimento fue que las muestras se congelaron y descongelaron en diversas ocasiones, lo que probablemente pueda afectar la estabilidad del material genético ya que como sabemos, es altamente sensible a los cambios de temperatura porque se comienza a desnaturalizar y, por lo tanto, disminuye la cantidad en la muestra.

Con respecto a la correcta administración de medicamentos en los animales es necesario tomarse en cuenta ya que el uso responsable de los mismos debe incluirse en un conjunto de medidas relacionadas entre otras cosas con el manejo, la bioseguridad, y con la importancia de un correcto diagnóstico, al respetar esto se garantiza la salud de los propios animales, además de la seguridad del usuario, del medio ambiente y, por ende, que el tratamiento tenga éxito. Este aspecto se considera importante en el desarrollo del presente trabajo, ya que las muestras que se procesaron tenían antecedentes de haber sido medicadas de manera excesiva para combatir la enfermedad, lo que pudo interferir en un diagnóstico acertado.

Aunque existan una serie de razones que han “justificado” el uso desmedido de antibióticos en la producción porcina, algunas de ellas siguen siendo válidas, pero otras requieren de un cambio de mentalidad y en el sistema de manejo. Entre las más comunes podemos encontrar: aparición de enfermedades bacterianas frente a las que no existen vacunas disponibles, sistemas de producción intensiva con diferentes puntos dentro del ciclo productivo que permiten la recirculación de agentes infecciosos, enfermedades epidémicas no bacterianas que afectan al sistema inmunitario de los cerdos favoreciendo la aparición de infecciones secundarias, problemas higiénicos asociados al sistema de alojamiento, instalaciones viejas que dificultan el control ambiental y el manejo de los animales, medidas de bioseguridad inadecuadas, concentración de granjas en la misma zona que facilitan la diseminación de enfermedades entre ellas, productores que utilizan los antibióticos “por costumbre”, temor a las posibles consecuencias sanitarias tras retirar el antibiótico, como el aumento de la incidencia de las diarreas, así como las limitaciones a la hora de diseñar nuevas instalaciones o invertir en la innovación.

Con lo anterior, se puede conocer la importancia de las condiciones con las que se trabaja una muestra y los cuidados en su procesamiento para tener la mayor calidad de la misma, ya que, si no es así, puede llevar a un diagnóstico erróneo.

De esta manera, con base en los cuadros de resultados y las imágenes mostradas se puede confirmar que sí se obtuvo material genético que al no corresponder con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, se cree que pudo haber sido del propio animal o de alguna otra bacteria presente en la muestra que haya podido contaminarla impidiendo la detección del microorganismo de interés.

Por otro lado, se encontró un estudio con grandes similitudes al que se trabajó en el laboratorio, es el descrito por Rodríguez, G (2012) en donde se usaron serotipos 1 y 5 los cuales fueron procesados de la misma forma que se describe en el presente trabajo ya que en su aislamiento, crecimiento, identificación, preservación, extracción, purificación y cuantificación del DNA se utilizaron los mismos métodos para la reactivación de los serotipos antes mencionados (controles positivos) y así establecer los límites de detección: ST1 = 4.94ng/μL , ST5 = 2.09ng/μL, que esto en comparación con el trabajo de Rodríguez, G. que obtuvo para el ST1 = 5.35ng/μL, ST5 = 2.95ng/μL. Además, el nivel de pureza en ambos casos fue igual debido a que se utilizó un rango de A260/A280 = 1.8±0.1, reiterando que los parámetros obtenidos en esta experimentación para la exclusión de las muestras y procesamiento por PCR son adecuados.

Por su parte, Tamiozzo, P. *et al* (2008) monitoreó cerdos asintomáticos mediante PCR, ocupando muestras de campo (tonsilas) previamente cultivadas en agar PPLO, esto a diferencia del presente estudio donde se realizó la extracción del DNA directo del órgano. Así mismo, Hernández, S. *et al* (2005) realizó la técnica de PCR como método de diagnóstico para *App* a partir de muestras de corazón, pulmón e hisopos nasales de lechones infectados experimentalmente con 2mL de una suspensión de 6x10⁷UFC/mL por lo que existían más probabilidades de hallar el material genético del microorganismo en estudio. De forma similar, Torres, M. (2019) en su trabajo describe que utilizó muestras de hisopado de las tonsilas del animal vivo y después las procesó mediante PCR. Lo que a diferencia del presente trabajo en donde se utilizaron muestras de campo (no inducidas experimentalmente) sospechosas de *App*, utilizando el órgano infectado, estas procedían de distintos rastros y granjas.

Por consiguiente, no se encontraron resultados de otros investigadores que coincidan en su totalidad con este trabajo, debido a que se difiere en el método de obtención de la muestra, ya que en algunos casos inocularon directamente la bacteria en el animal y posteriormente llevaron a cabo el procedimiento de extracción, en otros casos, obtienen la bacteria directamente de órgano y la hacen crecer en agar.

Finalmente, sin importar la metodología usada, todos los trabajos anteriores incluyendo este buscan una manera eficaz, reproducible y confiable para el diagnóstico oportuno de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina causada por el agente *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

10.- CONCLUSIÓN

La obtención de material genético de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir de pulmones y tonsilas pneumónicos de cerdo por medio del kit de extracción no fue contundente, no obstante, los métodos desarrollados para el aislamiento, crecimiento, identificación, amplificación (PCR), purificación, detección (Electroforesis horizontal) y cuantificación del material genético del microorganismo de interés fueron satisfactorios para los serotipos 1 y 5 (controles positivos) demostrando que la técnicas son reproducibles, específicas y eficaces. Así mismo, se enfatiza en la importancia de tener un buen manejo y procesamiento de la muestra de manera que se pueda llegar a un diagnóstico confiable y oportuno para brindar un tratamiento adecuado.

11.- REFERENCIAS

Burciaga, J. (2008). Interacción *in vitro* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* con células endoteliales de aorta de cerdo. [Versión electrónica]. (Tesis). Universidad Autonoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, México, Aguascalientes. 2pp-14pp. Recuperado el 26 de julio de 2020 de: <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/749/310028.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Calderón, R. (2007). Métodos Físicoquímicos en Biotecnología. [Versión electrónica]. UNAM. 25pp-57pp. Recuperado el 15 de julio de 2020 de: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>

Chacón, G (2017). Muestreo para la detección de agentes del complejo respiratorio porcino. Recuperado el 30 de julio de 2020 de: https://www.3tres3.com/articulos/muestreo-para-la-deteccion-de-agentes-del-complejo-respiratorio-porcin_37066/

Cortázar, A. (2004). Métodos Físicoquímicos en Biotecnología - PCR. [Versión electrónica]. UNAM. 9pp-11pp. Recuperado el 16 de julio de 2020 de: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>

Dennis W. Muñoz V. (2015). Técnicas de diagnóstico existentes para la detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae* causante de la Pleuroneumonía porcina. [Versión electrónica]. Avances en Ciencias Veterinarias. Vol.20, 4pp-9pp. Recuperado el 5 de marzo de 2020 de: <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl.pdf>

Delgado, F. (2012). Inmunohistoquímica avanzada. [Versión electrónica]. Málaga: FESITESS ANDALUCÍA. 71pp-83pp. Recuperado el 15 de julio de 2020 de: <https://docplayer.es/90378124-Inmunohistoquimica-avanzada.html>

Enríquez, I. (2013). Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a componentes de matriz extracelular de cerdo. [Versión electrónica]. Ciencia Veterinaria. Vol. 9, 269pp-293. Recuperado el 18 de febrero de 2020 de: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c9.pdf>

Espigares, D. Garza, L. Oliver, S. Carceles, S. (2019). Aspectos clave de las infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. [Versión electrónica]. PorciNews, LATAM, CEVA. 26pp-31pp. Recuperado el 22 de junio de 2020 de: <https://porcino.info/aspectos-clave-infecciones-actinobacillus-pleuropneumoniae/>

Espinoza, I. (2020). Complejo Respiratorio Porcino (CRP), un dolor de cabeza para el porcicultor. [Versión electrónica]. PorciNews LATAM. Recuperado el 23 de julio de 2020 de: <https://porcino.info/complejo-respiratorio-porcino-crp-un-dolor-de-cabeza-para-el-porcicultor/>

Ferri, E. (2017). *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) - Patogenia y Transmisión. Recuperado el 27 de febrero de 2020 de: <http://apps.sanidadanimal.info/cursos/enfermedades-infecciosas-porcinas/6/patogenia.htm>

García, N (2012). Pleuroneumonía porcina. [Versión electrónica]. Universidad de Cantabria, España. Departamento de Sanidad Animal. Microbiología e Inmunología, y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Vol. 234 35pp-44pp. Recuperado el 4 de marzo de 2020 de: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/porcinos/09-pleuroneumonia.pdf

Gerber, P. (2016). Enfermedades causadas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y su diagnóstico. Recuperado el 23 de junio de 2020 de: <https://www.portalveterinaria.com/porcino/articulos/12923/enfermedad-causada-por-actinobacillus-pleuropneumoniae-y-su-diagnostico.html>

Gottschalk, M. (2012). Nuevos avances en el diagnóstico y control de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, un patógeno todavía de actualidad. [Versión electrónica]. Conferencia extraída de Memorias del XI Congreso Nacional de Producción Porcina. Salta. Argentina. Recuperado el 6 de marzo de 2020 de: <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/nuevos-avances-diagnostico-control-t30113.htm>

Gottschalk, M. (2015). Patogenicidad de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. [Versión electrónica]. Published in IVIS SUIS. Vol. 121, 28pp-32pp. Recuperado el 11 de febrero de 2020 de: <http://www.ciap.org.ar/Sitio/Archivos/Patogenicidad.pdf>

Gottschalk, M. (2017). Diagnóstico de la infección causada por *App*. [Versión electrónica] Comunidad Profesional Porcina. Recuperado el 01 de agosto de 2021 de https://www.3tres3.com/articulos/diagnostico-de-la-infeccion-causada-por-app_37529/

Gottschalk, M. (2020). *Actinobacillus pleuropneumoniae* – ¿A qué nos enfrentamos? [Versión electrónica]. PorciNews, LATAM. 15pp-22pp. Recuperado el 22 de junio de 2020 de: <https://porcino.info/actinobacillus-pleuropneumoniae-que-nos-enfrentamos/>

Guía de uso responsable de Medicamentos Veterinarios. Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal. Recuperado el 22 de junio de 2020 de: <http://www.anprogapor.es/documentacion/Guias/Guia%20uso%20responsable%20de%20medicamentos%20porcino.pdf>

Gutiérrez, C. (2014). La pleuroneumonía en el contexto del complejo respiratorio porcino. [Versión electrónica]. Universidad de León, Servicio de Publicaciones. España. ISBN: 978-84-9773-676-3. Recuperado el 4 de marzo de 2020 de: https://www.researchgate.net/publication/303934319_La_pleuroneumonia_en_el_contexto_del_complejo_respiratorio_porcino

Hernández, R. (2002). Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, biotipo 1, serotipo1 de pulmones de cerdo, con y si lesiones neumónicas utilizando la técnica de inmunohistoquímica. [Versión electrónica]. Departamento de Microbiología e

Inmunología. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 18, 4pp-8pp. Recuperado el 7 de marzo de 2020 de: www.veterinariamexico.unam.mx

Hernández S, Alfonseca E., Sahagún A., Ramírez, G. (2005). DETECCIÓN DE ADN DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PLEURONEUMONIA PORCINA. [Versión electrónica]. Laboratorio de Inmunología Molecular Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ-UNAM. Recuperado el 21 de febrero de 2021 de https://www.amvec.com/memories/memorias/2005/2005_088.pdf

Herráez, A. (2010). Plásmidos en electroforesis: cómo interpretar un gel de DNA. Universidad de Alcalá, España. Recuperado el 23 de junio de 2020 de: <http://www.biorom.uma.es/contenido/biomodel/an/plasmido/0/probl.htm>

López, J. (2017). Pleuroneumonía Porcina por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Profilaxis vacunal. [Versión electrónica]. Sanidad. Laboratorios Imervec, SA. Vol. 121, 36pp-50pp Recuperado el 6 de febrero de 2020 de: https://www.35_SANIDAD.pdf

Monter, J. (2010). Infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un modelo murino. [Versión electrónica]. (Tesis). Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de sanidad, España. Recuperado el 5 de marzo de 2020 de: <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1587/Jose.pdf?sequence=1>

Moreno, B. (2015). Higiene e inspección de carnes II. Madrid, España. Ediciones Díaz de Santos, S.A.

Mori, L. (2007). Frecuencia de infección con *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas porcinas tecnificadas de Arequipa, Lima, Ica y La Libertad. [Versión electrónica]. (Tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Recuperado el 20 de febrero de 2020 de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172010000100019

Palomino, C. (julio-septiembre 2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Recuperado el 20 de febrero de 2020 de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020

Piñeros, R. (2018). Enfermedades endémicas que afectan la producción porcina en Colombia. Pleuroneumonía contagiosa porcina. [Versión electrónica]. Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario. Grupo de Medicina porcina ICA. Código: 00.04.28.10. Recuperado el 20 de febrero de 2020 de: <https://www.ica.gov.co/getattachment/86cbb781-a54d-4af5-acdc-e7733c4b7394/Pleuroneumonia-Contagiosa-Porcina.aspx>

Rodríguez, G. (2012). Detección e identificación simultánea y discriminación del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1, 5 y 7 por técnicas de PCR múltiple basadas en genes apxIVA y CPS. [Versión electrónica]. (Tesis), Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de ciencias Maestría en Ciencias Biológicas. 4pp-24pp. Recuperado el 13 de febrero de 2020 de: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/827>

Rubio, S. (2019). Prevención, control y tratamiento de las patologías más frecuentes en el ganado porcino. Recuperado el 4 de marzo de 2020 de: <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2016/10/14/103461.pdf>.

Sánchez, J. (2018). Tratamientos antibióticos de elección en México para diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. SANFER. Recuperado el 23 de junio de 2020 de: <https://www.porcicultura.com/destacado/Tratamientos-antibi%C3%B3ticos-de-elecci%C3%B3n-en-M%C3%A9xico-para-diferentes-serotipos-de-Actinobacillus-pleuropneumoniae>

Tamiozzo, P; Carranza, A., Pereyra, N., Pelliza, B., Di Cola, G., Ambrogi, R., Chanique, A., Ambrogi, A. (2008). Uso de Serología y N-PCR para la detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en Piara de Alto Nivel Sanitario. [Versión electrónica]. Departamento Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Recuperado el 21 de Febrero de 2021 de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_porcina/00-ix_congreso_pp/40-serologia.pdf

Torres, M. (2019). Determinación de la Presencia de *Actinobacillus Pleuropneumoniae* y su Relación con las Medidas de Bioseguridad en el Control de Signos Clínicos de la Enfermedad en Explotaciones Porcinas Brasileñas”. [Versión electrónica]. Recuperado el 21 de febrero de 2021 de https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/85269/1/TESIS%20FINAL_NAZAR%20%3%89%20TORRES%20SIMOES%20LISBOA_27_9_19.pdf

Williams, J. (2000). Aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en pulmones de cerdos con pleuroneumonía crónica sacrificados en el rastro

municipal de Mérida, Yucatán, México. [Versión electrónica]. Departamento de Epidemiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. Vol.11, 175pp-181pp. Recuperado el 6 de marzo de 2020 de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2000/bio003d.pdf>

Xu, Z., Zhou, Y., Li, L., Zhou, R., Xiao, S., Wan, Y., Zhang, S., Wang, K., Li, W., Li, L., Jin, H., Kang, M., Dalai, B., Li, T., Liu, L., Cheng, Y., Zhang, L., Xu, T., Zeng, H., Pu, S., Wang, B., Gu, W., Zhang, X., Zhu, G-F., Wang, S., Zhao, G-P. and Chen, H. (2008). Genomebiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03, an isolate of serotype 3 prevalent in China. Recuperado el 20 de marzo de 2020 de https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult?img=PMC2175527_pone.0001450.g005&query=&req=4&simResults=MPX1241_synpic40304