



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE GLÄSSER
CAUSADA POR *Haemophilus parasuis* EN MEXICO
CON LA TECNICA ERIC-PCR COMO METODO DE
DIAGNOSTICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
VLADIMIR MONTELONGO HERRERA

ASESORES: DR. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
DR. CARLOS PIJOAN AGUADE



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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

C. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estudio de la enfermedad de Glasser causada por
Haemophilus parasuis en México con la técnica
ERIC-PCR como método de Diagnóstico.

que presenta el pasante: Vladimir Montelongo Herrera
con número de cuenta: 9507335-4 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Marzo de 2005.

PRESIDENTE	<u>QFI. Andrea A. Becerril Osnaya</u>	
VOCAL	<u>MVZ. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Gabriela Escalante Reynoso</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Ladislao Palomar Morales</u>	

Agradecimientos:

A Dios.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Susana por todas sus enseñanzas, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Abel por compartir conmigo sus conocimientos.

A todos los profesores miembros del jurado por sus valiosas aportaciones y consejos para el mejoramiento de este trabajo.

Al profesor David y señor Gabino por la ayuda técnica brindada.

A las QFB's Olga Irigoyen, Ruth C. Delgado, Magali Gamboa, Rocío Juárez y Carmen Mondragón.

A todos mis amigos de la FES-C.

Lidia T., Edith, Erika, Tuti, Agustínfla, Chayito, Chío, Pepo, Najar, Isra, Cheque, Lizeth, Chucho, Jebús, Lalo, Cesarea, Jeny, Yesenia, Maqueda, Liliana, Raquel, Alex, Yuritzi, Charly, Gaddiel, Argel, Tania, Alejandra, Ceci, Aurora, Lorena, David, Yuriria.

Dedicatorias:

A mis padres Eleazar y Cruzita, los amo y gracias a su cariño y paciencia he podido llegar hasta aquí, todo se los debo a ustedes.

A mis hermanos Eleazar y Raquel por todo su apoyo y comprensión.

A mis abuelos Juan, Mari y Lola.

A mis compadres Dr. Luis Enrique y Dr. Rubén, su amistad durante casi veinte años ha sido muy valiosa.



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Virología y Microbiología,
Coordinación General de Estudios de Posgrado. Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán, Campo 1. UNAM.

ÍNDICE.

RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN.	
1.1 Importancia de las enfermedades respiratorias.	1
1.1.1 Complejo respiratorio porcino.	1
1.2 Enfermedad de Glässer.	4
1.2.1 Etiología.	4
1.2.2 Distribución.	6
1.2.3 Epidemiología.	6
1.2.4 Patogenicidad.	8
1.2.5 Cuadro clínico.	11
1.2.6 Diagnóstico.	13
1.2.7 Tratamiento.	16
1.2.8 Prevención y control.	18
1.3 El estudio de la PCR y las enfermedades respiratorias.	20
1.3.1 Secuencias ERIC.	22
1.3.2 Secuencias ARN 16s.	24
1.4 Justificación e hipótesis.	
1.4.1 Justificación.	25
1.4.2 Hipótesis.	26
2. OBJETIVOS.	
2.1 Objetivo general.	27
2.2 Objetivo particulares.	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	
3.1 Obtención de una cepa de <i>Haemophilus parasuis</i> .	28
3.2 Estandarización de la extracción de ADN de <i>Haemophilus parasuis</i> por el método fenol-cloroformo.	28
3.3 Estandarización de la técnica ERIC-PCR.	29
3.4 Obtención de cepas de <i>Streptococcus suis</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> y <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 2.	31
3.4.1 Extracción de ADN de cepas bacterianas.	31
3.5 Prueba de especificidad.	32
3.6 Muestreo.	
3.6.1 Muestreo en pulmones.	32
3.6.2 Muestreo en líquido cefalorraquídeo.	33
3.6.3 Muestreo en cornetes nasales.	34
3.7 Prueba de ERIC-PCR con las muestras obtenidas.	35
3.8 Estandarización de la PCR con los iniciadores Hps-R y Hps-F.	36
3.9 Detección de <i>Haemophilus parasuis</i> con oligonucleótidos <i>Hps</i> .	37
4. RESULTADOS.	38
5. DISCUSIÓN.	51
6. CONCLUSIONES.	56
7. REFERENCIAS.	57

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Tabla 1. Bacterias involucradas en procesos respiratorios.	2
Tabla 2. Agentes tradicionales y actuales.	3
Tabla 3. Reacciones bioquímicas diferenciales bacterias NAD-dependientes aisladas de cerdos.	14
Tabla 4. Porcentaje de resistencia de <i>H. parasuis</i> a diferentes antimicrobianos.	17
Tabla 5. Secuencias ERIC.	23
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados.	29
Tabla 7. Oligonucleótidos Hps.	36
Tabla 8. Aislamientos de <i>Haemophilus parasuis</i> de pulmones de cerdo.	42
Tabla 9. Aislamientos de <i>Haemophilus parasuis</i> de Líquido cefalorraquídeo.	43
Tabla 10. Aislamiento de <i>Haemophilus parasuis</i> de muestras de cornetes nasales de cerdos.	44
Figura 1. Morfología de <i>Haemophilus parasuis</i> .	5
Figura 2. Enfermedad de Glässer: forma respiratoria.	12
Figura 3. Muestreo en pulmón.	33
Figura 4. Muestreo en Líquido cefalorraquídeo.	33
Figura 5. Muestreo en cornetes nasales de cerdo.	34
Figura 6. Estandarización de la técnica ERIC-PCR.	38
Figura 7. Prueba de especificidad de la técnica ERIC-PCR.	39
Figura 8. Prueba de especificidad de los oligonucleótidos Hps.	40
Figura 9 . Aislamiento de <i>Haemophilus parasuis</i> .	41
Figura 10. Perfiles de fragmentos de ADN amplificados con ERIC-PCR de muestras de pulmón.	45
Figura 11. Fragmentos de ADN amplificados con oligonucleótidos Hps-R y Hps-F de muestras de pulmón.	46
Figura 12. Fragmentos de ADN amplificados con oligonucleótidos Hps-R y Hps-F de muestras de líquido cefalorraquídeo.	47
Figura 13. Perfiles de fragmentos de ADN amplificados con ERIC-PCR de muestras de líquido cefalorraquídeo.	48
Figura 14. Fragmentos de ADN amplificados con oligonucleótidos Hps-R y Hps-F de muestras de cornetes nasales.	49
Figura 15. Perfiles de fragmentos de ADN amplificados con ERIC-PCR de muestras de cornetes nasales.	50

LISTA DE ABREVIATURAS.

- ADN** - Ácido desoxirribonucleico.
ARN - Ácido ribonucleico.
BHI - Infusión cerebro corazón.
CA - Conversión alimenticia.
CF - Fijación de complemento.
dNTP- Deoxinucleótido trifosfato
ELISA - Enzimoimmunoensayo.
ERIC - Consenso Enterobacterial Repetitivo Intergénico.
ERIC-PCR - Reacción en cadena de la polimerasa de secuencias Consenso Enterobacterial Repetitivo Intergénico.
GDP - Ganancia Diaria de peso.
Hps - *Haemophilus parasuis*.
Hps-R - Antisentido (oligonucleótido) de Hps.
Hps-F - Sentido (oligonucleótido) de Hps.
IHA - Hemaglutinación Indirecta.
IHC - Inmunohistoquímica.
LCR - Líquido cefalorraquídeo.
LOS - Lipooligosacáridos.
MEW - Destete precoz medicado.
mg - Miligramos
mL - Mililitros
mM - Milimolar
NAD - Dinucleótido Nicotinamida Adenina.
OSCPH - Hibridación en placa de captura de oligonucleótidos específicos.
PAGE - Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb - pares de bases.
PBS - Amortiguador salino de fosfatos.
PCR - Reacción en cadena de la polimerasa.
PPLO - Organismosv semejantes a pleuropneumoniae.
PRRS - Síndrome Reproductivo y Respiratorio del cerdo.
REP - Secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas.
Rep-PCR - Reacción en cadena de la polimerasa de Secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas.
rpm - Revoluciones por minuto.
SEW - Destete precoz.
SPF - Libre de patógenos específicos.
tbp- Proteína unida a la caja TATA.
UFC - Unidades formadoras de colonias.
µg - Microgramos.
µL - Microlitros.
µM - Micromolar.
V - Volts.

RESUMEN.

La enfermedad de Glässer, es producida por la bacteria *Haemophilus parasuis*. Esta enfermedad esta contemplada como una afección esporádica, asociada a situaciones Pos-éstress principalmente en cerdos en la etapa de destete. Sin embargo, en granjas con elevado grado de sanidad la enfermedad puede producir una elevada morbilidad y mortalidad en todas las etapas de producción.

El agente etiológico de la enfermedad fue descrito por primera vez por Glässer en 1910, como un bastón pequeño gram negativo. Una de sus principales características es su requerimiento de factor V (NAD) para su crecimiento. El cerdo es el único hospedero de este agente patógeno. La infección por *Haemophilus parasuis* es particularmente problemática sobre el aparato respiratorio. Actualmente se tienen identificados 15 serotipos, de los cuales el 4 y 5 son los más prevalentes en los aislamientos en casos de campo alrededor del mundo. El sitio inicial de colonización parece ser el tracto respiratorio alto de los cerdos, preferentemente la mucosa nasal, aunque puede ser aislado también del área tonsilar y de otros sitios respiratorios. En el cuadro clínico se describen 4 formas: La enfermedad de Glässer o poliserositis fibrinosa, la septicemia, la miositis aguda y la enfermedad respiratoria.

El diagnóstico se basa en los signos clínicos en presencia y ausencia de lesiones en la necropsia, y en el cultivo bacteriológico. Actualmente existen tres pruebas de PCR para el diagnóstico de *Haemophilus parasuis*. La primera radica en las peculiaridades observadas en los genes *tbp* de las cepas. La segunda prueba es La ERIC-PCR que está basada en la amplificación de secuencias de consenso enterobacterial repetitivo intergénico y la tercera prueba de PCR con la cual se amplifica un fragmento de 821pb de la región que codifica para el ARN 16s.

Se ha mostrado que la ERIC-PCR es eficaz para clasificar diferentes especies bacterianas y para discernir entre las cepas de una misma especie, mientras que la prueba de PCR que amplifica un fragmento de 821pb detecta al *Haemophilus parasuis* de muestras clínicas y define la prevalencia de las infecciones.

En el estudio estas dos pruebas fueron estandarizadas en el laboratorio como método de diagnóstico de *Haemophilus parasuis* con el objetivo de evaluar la ERIC-PCR para el posterior estudio de la enfermedad de Glässer. El estudio se llevó a cabo con cepas de *Haemophilus parasuis* aisladas de muestras obtenidas de pulmón, cornetes nasales y líquido cefalorraquídeo de diferentes cerdos en granjas de México. Con la ERIC-PCR utilizando los oligonucleótidos ERIC1R y ERIC2 se obtuvieron diversos patrones de huellas genómicas, en tanto que con los oligonucleótidos *Hps* se amplificaron fragmentos de 821pb. La prueba de PCR con oligonucleótidos *Hps* detecto de manera específica a la bacteria *Haemophilus parasuis* incluso con muestras contaminadas. La técnica de ERIC- PCR nos permitió diferenciar entre las cepas aisladas de una misma granja, esto es importante ya que con esto se podrá realizar posteriormente estudios sobre la epidemiología en granjas de todo el país.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Importancia de las enfermedades respiratorias.

Las enfermedades respiratorias son junto con las enfermedades entéricas, un fenómeno que afecta al sector porcino acarreado graves consecuencias económicas. Se sabe que las enfermedades respiratorias son las más comunes y costosas en cerdos desde el inicio a la finalización (Tielen,1995).

El conocimiento de los procesos patológicos que afectan la función respiratoria de los porcinos se ha incrementado notablemente, y los efectos de las enfermedades respiratorias en la redituabilidad de las empresas porcinas son bien conocidas. Por esta razón los esfuerzos van encaminados a controlar las enfermedades. Existen sistemas de manejo y producción que se han desarrollado y puesto en práctica con el objetivo principal de evitar el efecto negativo de cualquier infección en una población (Iglesias y Trujano, 2000).

Las enfermedades respiratorias se observan en forma de neumonía y pleuritis. La amplia gama de agentes bacterianos y virales que causan estas enfermedades pueden actuar como microorganismos primarios o como agentes secundarios; sin embargo, algunos de estos agentes etiológicos son de gran importancia por sí mismos debido a su prevalencia, impacto económico o implicación en programas de erradicación nacional (Tielen, 1995).

1.1.1 Complejo respiratorio porcino.

El cerdo con excepción de las aves, es la única especie que ha sido objeto de transformaciones biológicas, resultado de los avances en la ingeniería genética y en la medicina veterinaria (Ciprián y Mendoza, 2001a).

La clave del éxito de la porcicultura moderna radica en aumentar los índices de ganancia diaria de peso (GDP) y aumentar la conversión alimenticia (CA). Estos parámetros se afectan seriamente por las enfermedades crónicas especialmente las neumónicas. En este aspecto las neumonías juegan un papel importante, debido al tipo de explotación intensiva al que es sometido el ganado porcino (Ciprián y Mendoza, 2001a).

El Complejo respiratorio del cerdo es un proceso dinámico que involucra una variedad de agentes. Algunos como el *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* o el virus de Aujeszky, son primarios. Otros como *Haemophilus Parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* o *Streptococcus suis* son secundarios y requieren un evento inmunosupresor previo. La mejor manera de controlar y prevenir el Complejo respiratorio, es el manejo controlado de la granja con fundamentos de bioseguridad y en segundo lugar, mejorar el estatus sanitario de la población mediante el uso de productos biológicos específicos contra los microorganismos involucrados en cada granja (Estrada, 1997).

Tabla 1. Bacterias involucradas en procesos respiratorios.

Patógenos primarios.	Patógenos secundarios.
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Haemophilus parasuis</i>
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
	<i>Streptococcus suis</i>
	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
	<i>Actinomyces pyogenes</i>

Últimamente la evidencia indica que en los procesos respiratorios de los cerdos hay participación de microorganismos que hace algunos años no aparecían en la lista; por ejemplo: *Haemophilus parasuis* (Iglesias y Trujano, 2000).

Esto quiere decir que con los controles actuales en la producción, algunas enfermedades están perdiendo protagonismo. En la siguiente tabla se muestran los microorganismos tradicionales y los microorganismos actuales.

Tabla 2. Agentes tradicionales y actuales.

Agentes tradicionales	Agentes actuales
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Haemophilus parasuis</i>
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Streptococcus suis</i>
VPRRS	<i>Staphylococcus hyicus</i>
Virus de la influenza porcina	<i>Actinobacillus suis</i>
<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Brachyspira pilosicoli</i>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	VPRRS
Adenovirus	Circovirus porcino.

Tomado y adaptado de Torres, 2004.

1.2 Enfermedad de Glässer.

Definición.

La enfermedad de Glässer o poliserositis infecciosa porcina, es una enfermedad que a lo largo de las décadas se le ha contemplado como una afección esporádica, asociada a situaciones pos-estrés, la cual afecta principalmente a cerdos de 2 semanas a 4 meses de edad en el caso de cerdos convencionales, pero en granjas con un elevado grado de sanidad (SPF) o en las que se maneja el destete precoz o destete precoz medicado (SEW, MEW) la enfermedad se puede convertir en una afección explosiva, produciendo una elevada morbilidad y mortalidad en todas las etapas de producción dentro de la granja. En donde puede causar poliseritis, poliartritis, miositis, septicemia, meningitis y muerte (Ciprián y Mendoza, 2001b).

1.2.1 Etiología.

Haemophilus parasuis fue descrito por Glässer, en 1910, como un bastón pequeño gram negativo, sin embargo esta bacteria a lo largo de los años ha recibido diversas denominaciones. Leche en 1960 la clasifico inicialmente como *Haemophilus suis* y como *Haemophilus influenza suis*. Al observar su independencia del factor X de coagulación de la sangre (hemina u otras porfirinas) se le cambió el nombre a *Haemophilus parasuis* (Kilian, 1976). Aún no se sabe exactamente la posición taxonómica dentro de la familia Pasteurellaceae debido a la falta de homología a nivel de ADN con otras bacterias del género *Haemophilus* (Morozumi y Nicolet, 1986).

La caracterización bioquímica primaria del agente etiológico de la enfermedad de Glässer sugería era muy similar a *Haemophilus suis*, el cual requiere tanto el factor X como el factor V (Nicotinamida adenina dinucleótido) para su crecimiento. Sin embargo, más tarde se demostró *Haemophilus parasuis*

requiere para crecer solamente el factor V (NAD). Una nueva especie, *Haemophilus parasuis*, fue propuesta, usando el prefijo "para" por no requerir del factor X para su crecimiento (Oliveira y Pijoan, 2003).

Microscópicamente, *Haemophilus parasuis* es un pequeño bacilo o cocobacilo pleomórfico. Se agrupa solo, en pares e incluso en cadenas filamentosas, de longitud variable, desde 1 a 7 μm de largo y 0,2 a 2 μm de ancho, gram negativo, que manifiestan la presencia de cápsula en cultivos *in vitro*. La dependencia del factor V se resuelve mediante la adición directa de NAD (0,025%) a los medios de cultivo, en formulaciones que incorporan sangre calentada (ágar chocolate) o mediante el satelitismo alrededor de colonias de *Staphylococcus aureus* o *S. epidermidis*. Al cabo de 24-48 horas a 37°C, en atmósfera aerobia o mejor en microaerofilia (en aislamientos primarios, fundamentalmente), dan lugar a colonias pequeñas, de 12 μm de diámetro, translúcidas y no hemolíticas (en ágar con 5% de sangre de caballo) (Ferri *et al.*, 2000).

Poseen actividad catalasa, oxidasa y reducen los nitratos a nitritos. Carecen, sin embargo, de actividad ureasa; no producen indol ni descarboxilan la ornitina, lisina y arginina. Producen ácido de la glucosa, manosa, maltosa y sacarosa, pero son negativos sobre la xilosa, lactosa, manitol, ramnosa y arabinosa (Ferri *et al.*, 2000).

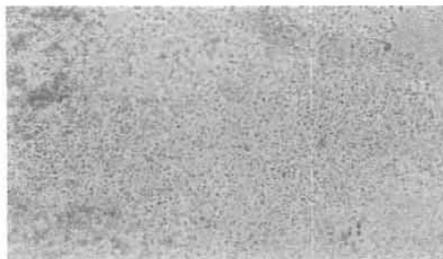


Figura 1. Morfología de *Haemophilus parasuis*. Microscopio óptico (100x).
Tomada de Ferri *et al.*, 2000.

1.2.2 Distribución.

Debido que a lo largo de la historia se ha conceptualizado al *Haemophilus parasuis* como un microorganismo que actúa en forma secundaria y debido a su naturaleza heterogénea y a la dificultad para manejar las muestras clínicas y lograr el primoaislamiento, no se sabe a ciencia cierta si es un microorganismo ubicuo o no. Gracias a los estudios realizados para diferenciar los serotipos existentes se sabe esta distribuido en E.U.A., Alemania, Canadá, Australia y Brasil (Ciprián y Mendoza, 2001b).

En México también se ha aislado el *Haemophilus parasuis* pero se han realizado hasta el momento muy pocos estudios, solo se puede encontrar una sola referencia en cuanto a serotipificación. Este estudio es el realizado por Herrera *et al* (2003) con muestras obtenidas de granjas de los estados de Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Nvo. León, Oaxaca , Puebla, Veracruz, Sonora y Yucatán.

Las muestras en este trabajo fueron cultivadas en México y se determinó por el tipo de crecimiento que eran de *Haemophilus parasuis*, posteriormente fueron suspendidas en una solución salina con formalina y se enviaron a la Universidad de Montreal para su serotipificación (Herrera *et al.*, 2003).

1.2.3 Epidemiología.

El cerdo es el único hospedero de varios agentes patógenos, incluyendo a *Haemophilus parasuis*. La bacteria se recupera generalmente de las fosas nasales, en ocasiones sin cuadro clínico alguno, hasta el punto de representar una de las especies bacterianas más prevalentes en el caso de lechones de una semana de edad, y de los pulmones con neumonía (Moller *et al.*, 1993).

La infección por *Haemophilus parasuis* es particularmente problemática sobre el aparato respiratorio. La presencia de *Haemophilus parasuis* en las fosas nasales, a las que coloniza, no implica la existencia de un proceso morboso y, por lo general, tiene lugar en animales protegidos inmunitariamente. En el caso del pulmón se comporta, habitualmente, como un invasor secundario, oportunista, que produce enfermedad asociado con otros agentes bacterianos (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*) o víricos (virus de la enfermedad de Aujeszky, virus del PRRS, virus influenza, coronavirus porcinos, etc.) o coincidiendo con una falta de inmunidad protectora específica, lo que da lugar a lesiones pulmonares que recuerdan las de la neumonía enzoótica. Ocasionalmente se ha podido demostrar su condición de agente etiológico respiratorio primario, especialmente en casos de bronconeumonía fibrinosupurativa. En cualquier caso, parece claro que el tracto respiratorio actúa como puerta de entrada del microorganismo, y que en ocasiones se produce la infección sistemática generalizada y, por tanto, la enfermedad clínica. (Ferri *et al.*, 2000).

La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre *Haemophilus parasuis* están basados en la información que nos da la serotipificación. De los 15 serotipos identificados (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992), los serotipos 4 y 5 fueron los más prevalentes en aislamientos de casos de campo en Japón (Morickoshi *et al.*, 1990), Alemania (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992), Estados Unidos (Rapp-Gabrielson and Gabrielson, 1992) y España (Rubies *et al.*, 1999). Los aislamientos australianos han sido principalmente serotipos 5 y 13 (Rafiee and Blackall, 2000).

En México, de un total de 20 aislamientos, los serotipos encontrados y el porcentaje de los mismos indican el serotipo con mayor prevalencia es el serotipo 4 que fue aislado en 13 muestras dando un porcentaje de 60%, el segundo porcentaje más alto fue el del serotipo 12 en 4 muestras y un porcentaje de 20%,

los serotipos 1, serotipo 13 y una muestra no tipificable tienen un porcentaje del 5% cada uno (Herrera *et al.*, 2003).

1.2.4 Patogenicidad.

El sitio inicial de colonización por *Haemophilus parasuis* en el tracto respiratorio alto de cerdos es todavía controversial. El organismo ha sido consistentemente aislado de cavidad nasal y traquea, raramente de pulmones y tonsilas cuando se hace una inoculación intranasal de cerdos (Oliveira y Pijoan, 2003).

Varios autores sugieren que *Haemophilus parasuis* puede preferencialmente colonizar la mucosa nasal de cerdos, pero el organismo puede también ser aislado del área tonsilar y de otros sitios respiratorios, como la traquea por ejemplo (Oliveira y Pijoan, 2003).

Los datos disponibles sobre la patogénesis del proceso proceden, por lo general, de modelos experimentales de infección, casi siempre cerdos inoculados intranasalmente con cepas virulentas de *Haemophilus parasuis*. En estas condiciones, a las 12 horas de la inoculación se aísla el agente de la cavidad nasal y de la tráquea, mientras que a las 36 horas ya se recupera de la sangre. Entre las 36 y 108 horas posteriores se recupera con carácter sistémico (Moller *et al.*, 1993).

Mediante procedimientos inmunohistoquímicos y por microscopía electrónica se ha comprobado la colonización precoz de la porción media y caudal de la cavidad nasal y de la tráquea, que se asocia con rinitis purulenta, pérdida de cilios y dilatación de las células de la mucosa nasal y traqueal. *Haemophilus parasuis* coloniza preferentemente la cavidad nasal y la tráquea, pero no las tonsilas (al contrario que *A. pleuropneumoniae*), lo que se relaciona con la capacidad para aislar este microorganismo de las fosas nasales pero no de las tonsilas o de los

pulmones sanos, a partir de las muestras de cerdos en el matadero (Moller *et al.*, 1993).

La cápsula, fimbrias y otras proteínas de membrana externa (OMP) han sido asociadas con la colonización del tracto respiratorio alto por varios miembros de la familia *Pasteurellaceae*, incluyendo el género *Haemophilus* (Nicolet, 1990).

La asociación entre expresión capsular, perfiles de proteínas de membrana externa, y virulencia de *Haemophilus parasuis*, es controversial. Se ha reportado la mayoría de las cepas aisladas del tracto respiratorio alto de cerdos sanos son encapsuladas, mientras el aislamiento de cepas de sitios sistémicos fueron predominantemente no encapsuladas. Sin embargo con cepas encapsuladas de *Haemophilus parasuis* se ha demostrado que el encapsulamiento es cualitativamente reducido después de realizar pases *in vitro* (Rapp-Gabrielson *et al.*, 1992).

Estudios realizados con perfiles de proteínas de célula-completa sugieren una potencial patogenicidad de cepas de *Haemophilus parasuis* con la participación de un grupo mayor de proteínas de alrededor de 37 kDa. Estas fueron clasificadas por electroforesis en gel de poliacrilamida como PAGE tipo II, entre tanto los otros aislamientos carentes de estas proteínas fueron clasificados como PAGE tipo I (Morozumi y Nicolet, 1986).

Se ha examinado la producción de lipooligosacáridos (LOS) por *Haemophilus parasuis*, y se encontró que cepas virulentas y no virulentas comparten patrones similares. *Haemophilus parasuis* produce estructuras parecidas a fimbrias después de pasajes *in vivo*, pero el aislamiento común de este organismo de la cavidad nasal de animales aparentemente sanos plantea el cuestionamiento si el clásico concepto de adhesión al sitio de entrada es prerrequisito para la iniciación de la invasión (Nicolet 1990).

Los serotipos han sido usados comúnmente como indicadores de virulencia. Inoculaciones intraperitoneales a cerdos SPF con los serotipos 1, 5, 10, 12, 13 y 14 causan muerte o morbilidad en cuatro días, y esas cepas fueron clasificadas como altamente virulentas. Los serotipos 2, 4 y 15 causan poliserositis, pero no muerte, y fueron clasificados como moderadamente virulentos. Los restantes serotipos (3, 6, 7, 8, 9, 11) no producen signos clínicos y fueron considerados no virulentos (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992; Amano *et al.*, 1994).

Un estudio reciente de prevalencia en rebaños de Norte América muestra las cepas potencialmente patógenas, de sitios sistémicos, fueron de serotipos 2, 4, 5, 12, 13, 14 o no tipificables; los del tracto respiratorio alto de animales sanos son genéticamente homogéneos (diferentes de los aislamientos de sitios sistémicos) predominando el serotipo 3 o no tipificables (Oliveira *et al.*, 2003).

Algunos autores creen que alteraciones de la mucosa pueden permitir que *Haemophilus parasuis* invada y gane el acceso a torrente sanguíneo, pero ni la microscopia electrónica, y prueba de inmunohistoquímica han asociado a la bacteria en áreas de cilia perdida y degeneración celular. Esto sugiere que una toxina soluble de *Haemophilus parasuis* pueda estar asociada con el daño celular observado (Oliveira y Pijoan, 2003).

Aunque el daño a la mucosa nasal facilita la invasión de *H. parasuis*, en cualquier caso, se desconocen los factores implicados en la infección sistémica, aunque resulta muy destacable la virulencia de algunas cepas, capaces de producir enfermedad generalizada y muerte en cerdos inoculados intranasalmente con solo 100 UFC. En animales sometidos a estas condiciones, la bacteremia resulta evidente en las primeras etapas de la infección (Ferri *et al.*, 2000).

Actualmente se han referido a la detección de una enzima, neuraminidasa (sialidasa), cuya presencia se hace evidente al final de la fase de crecimiento logarítmico, que se asocia a las células y que no requiere Ca^{++} para su actividad. Su función en la biología de *Haemophilus parasuis* podría estar relacionada con la supervivencia intracelular (Lichtensteiger y Vimr., 1997).

1.2.5 Cuadro clínico.

En la pira afectada, los signos que se manifiestan incluyen fiebre y apatía, seguidos de inapetencia y anorexia. Los primeros signos son tos, disnea, pérdida de peso, cojeras y enrojecimientos. Pueden apreciarse, igualmente, manifestaciones de dolor al caminar, hinchazón de las articulaciones, escalofríos y temblores, así como incoordinación, cianosis, reclinación y, por último, puede sobrevenir la muerte del animal. Existen visibles secuelas de los procesos agudos, tanto en las hembras reproductoras (en forma de abortos y cojeras crónicas) como en los verracos o en los animales en crecimiento, en los que puede ser manifiesta una menor tasa de engorda (Rapp-Gabrielson, 1996). El cuadro clínico depende de la localización de las lesiones inflamatorias. Según esto, se describen cuatro formas clínicas: la enfermedad de Glässer (propriadamente dicha o también llamada poliserositis fibrinosa), la septicemia (sin lesiones de poliserositis), la miositis aguda (en los músculos maseteros) y la enfermedad respiratoria (Ferri *et al.*, 2000).

Las lesiones macroscópicas primarias consisten en la presencia de un exudado serofibrinoso o fibrinopurulento en las superficies mucosas, de forma localizada o en presencia múltiple, incluyendo el peritoneo, el pericardio y la pleura, así como en las superficies articulares, particularmente en el carpo y tarso. La presencia de neumonía no es un suceso habitual, incluso aunque el microorganismo haya sido aislado de los pulmones. Según algunos autores, las diferencias en la capacidad para producir neumonía pueden deberse a las diferencias en el modo de infección, a las dosis infectantes y al potencial patógeno

de las cepas implicadas, al menos según se desprende de los datos derivados de infecciones experimentales: por ejemplo, los serotipos 1, 4 y 5 no se distinguen por su capacidad para producir neumonía (Amano *et al.*, 1994). En los casos septicémicos se observa la presencia de petequias y equimosis en el hígado, riñón y meninges, detectándose también altos niveles de endotoxinas en el plasma, así como trombos de fibrina en muchos órganos. La replicación subsiguiente del microorganismo en las superficies serosas produce la poliserositis, poliartritis y meningitis que se observan en los casos típicos de campo. Con menor frecuencia, puede observarse un proceso septicémico agudo que incluye cianosis, edema subcutáneo y pulmonar y muerte, todo ello en ausencia de los típicos signos inflamatorios de las mucosas (Amano *et al.*, 1994).

Las meninges son una de las zonas de inflamación más frecuentes de la enfermedad llegando, en ocasiones, a presentarse en el 80% de los animales enfermos. En los casos muy graves puede apreciarse meningitis, opacidad de las membranas del cerebro (región occipital) y cerebelo. Habitualmente se produce un aumento del líquido cefalorraquídeo, que presenta un aspecto lechoso debido a la abundancia de glóbulos blancos. Ocasionalmente, se ha descrito meningoencefalitis trombótica, con depósitos de fibrina en meninges y vasos sanguíneos y, otras veces, edema moderado (Segales, 1996).

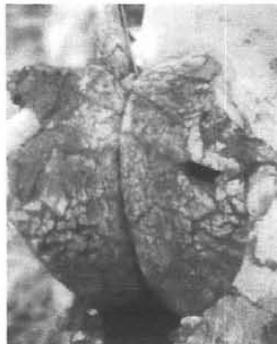


Figura 2. Enfermedad de Glässer: forma respiratoria. Aspecto pulmonar.
Tomada de Ferri *et al.*, 2000.

1.2.6 Diagnóstico.

Una de las dificultades para el diagnóstico correcto de *Haemophilus parasuis* es la carencia de métodos diagnósticos rápidos y sencillos, así como capaces de diferenciar los serotipos presentes, cuestión que es sumamente importante ya que se ha demostrado pueden existir diferentes serotipos de la bacteria en una misma granja, la protección de la mayoría de las bacterinas comerciales es serotipo específica y algunos serotipos de las cepas de campo no producen inmunidad adecuada para ofrecer una protección real, razón por la cual algunas autobacterinas pueden no dar resultados satisfactorios. El diagnóstico de la infección por *Haemophilus parasuis* está basado únicamente en signos clínicos, en presencia o ausencia de lesiones en la necropsia, y en el cultivo bacteriológico. (Vahle *et al.*, 1997).

Haemophilus parasuis depende de una fuente externa de NAD para su aislamiento y crecimiento, las muestras clínicas rutinariamente se cultivan sobre agar sangre con una cepa adyacente de *S. aureus*, posteriormente en PPLO con suplemento de NAD o sobre agar chocolate (Segales, 1996).

El diagnóstico diferencial incluye otras bacterias no hemolíticas dependientes del factor V, tales como *Actinobacillus indolicus*, *Actinobacillus porcicus* y *Actinobacillus minor*, como se muestra en la tabla 3. La naturaleza fastidiosa de *Haemophilus parasuis* a menudo perjudica el aislamiento de estos organismos de muestras clínicas. El uso de antibióticos (tales como Lincomicina y Bacitracina) en el medio de cultivo pueden mejorar la recuperación de muestras clínicas contaminadas. (Pijoan *et al.*, 1983).

TABLA 3. Reacciones bioquímicas diferenciales de bacterias NAD-dependientes aisladas de cerdos.

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

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

Técnicas alternativas han sido propuestas para el diagnóstico de infecciones por *Haemophilus parasuis*. El organismo se ha detectado, en muestras clínicas de animales infectados experimentalmente, por inmunohistoquímica (IHC), que también permite la detección de los organismos no viables en el citoplasma de células fagocíticas (Segales, 1996).

Otro método de diagnóstico son los ensayos de hibridación en placa de captura de oligonucleótidos específicos (OSCPH), es muy sensible detectando < 100 UFC/ mL en cultivos puros. Sin embargo se presentan reacciones cruzadas con aislamientos de *Actinobacillus indolicus* (Casamglia *et al.*, 1999).

El diagnóstico serológico de *Haemophilus parasuis* es inconsistente e inexacto. La detección de anticuerpos contra *Haemophilus parasuis* han sido realizados por fijación del complemento (CF) (Nielsen, 1993), pruebas de hemaglutinación indirecta (IHA) (Miniats *et al.*, 1991) y por enzimoimmunoensayo (ELISA) (Solano-Aguilar *et al.*, 1999).

También una prueba de PCR promete una mejor sensibilidad al detectar *Haemophilus parasuis* de muestras clínicas. Esta técnica amplifica las región que codifica para el ARN 16s. Este ensayo detecta desde 10² UFC/mL, y se cree es mucho más sensible que el aislamiento tradicional. (Oliveira *et al.*, 2001).

Recientemente se ha desarrollado una PCR que permite la detección e identificación de la especie *Haemophilus parasuis*, tanto a partir de muestras clínicas como en cepas aisladas en el laboratorio. El fundamento técnico del método desarrollado radica en las peculiaridades observadas en los genes *tbp* de las cepas de este microorganismo, respecto de otros patógenos porcinos próximos como *Actinobacillus suis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El método permite discriminar un positivo a *Haemophilus parasuis* de un positivo a *Actinobacillus pleuropneumoniae* y, lo que es más importante, otras cepas no patógenas de la familia Pasteurellacea presentes en el cerdo (*Actinobacillus minor*, *Actinobacillus porcinus* y *Actinobacillus indolicus*) ofrecen resultados negativos (Ferri *et al.*, 2000).

1.2.7 Tratamiento

El tratamiento es con antibióticos basándose en pruebas de sensibilidad (antibiograma), hasta el momento no existe un antibiótico autorizado, que sea específico contra el *Haemophilus parasuis*. El antibiótico que se vaya a emplear debe ser administrado lo más temprano posible con respecto a la infección buscando la "prevención" (Rosales, 2001).

En los brotes graves de la enfermedad de Glässer, el uso de antibióticos tanto con fines terapéuticos como preventivos, posee un escaso valor, debiéndose administrar, parenteralmente, dosis altas (de los productos más convenientes por lo general, penicilina, aunque se han descrito cepas resistentes) al comienzo de la infección, cuando empiezan a manifestarse signos clínicos; se debe tratar, además, la totalidad del grupo, sin esperar a que manifiesten signos o síntomas. (Trigo *et al.*, 1996).

Se sabe que los antibióticos que pueden ser utilizados para el tratamiento en contra de *Haemophilus parasuis* son penicilina, ampicilina, trimetoprim con sulfonamidas y tetraciclinas. También se ha reportado los antibióticos menos efectivos contra *Haemophilus parasuis* son los aminoglucosidos y sulfonamidas. En otros trabajos se han encontrado cepas resistentes a diferentes tipos de antibióticos (Ciprián y Mendoza, 2001b). En la tabla 4 se muestra el porcentaje de resistencia de *Haemophilus parasuis* a diferentes antimicrobianos.

Tabla 4. Porcentaje de resistencia de *H. parasuis* a diferentes antimicrobianos.

AGENTE ANTIMICROBIANO	% DE RESISTENCIA
Ampicilina	0.0
Enrofloxacina	0.0
Cefalotina	0.0
Ceftiofur	2.1
Penicilina	2.1
Sulfaclopiridazina	2.1
Gentamicina	4.3
Epectinomicina	4.3
Trimetoprim/sulfa	6.4
Amikacina	6.4
Eritromicina	10.6
Tetraciclina	14.9
Neomicina	21.3
Apralan	29.8
Clindamicina	40.4

Tomado de Ciprián y Mendoza 2001b.

Las medidas profilácticas de administración de antibióticos en granjas de cerdos SPF no han demostrado una gran eficiencia al no poder reducir la morbilidad y la mortalidad ante un brote de la enfermedad de Glässer, debido a que los efectos han sido poco benéficos y de corta duración. Por lo que posiblemente el sistema más adecuado de control de la enfermedad sea la medicación individual y el uso de bacterinas que incluyan el serotipo o los serotipos involucrados en el brote y presentes en la granja (Ciprián y Mendoza, 2001b).

1.2.8 Prevención y control.

La eliminación de *H. parasuis* de la granja puede no ser un objetivo deseable, puesto que como consecuencia de la mezcla de cerdos de distintas edades con otros que albergan *H. parasuis* durante las últimas etapas de la producción, puede darse lugar a un brote de enfermedad con efectos devastadores desde el punto de vista económico. Por esta razón, la introducción de nuevos lotes con diferentes estados de salud debe ir acompañada de periodos de aislamiento y aclimatación suficientemente largos para que se desarrolle inmunidad protectora, por vacunación o por exposición natural al agente (Solano-Aguilar *et al.*, 1999).

La inmunidad natural y/o materna constituyen factores críticos para el control de la enfermedad de Glässer. Los cerdos expuestos con anterioridad a cepas avirulentas de *Haemophilus parasuis* desarrollan resistencia a la exposición con cepas virulentas (Nielsen, 1993). La vacunación de las cerdas gestantes proporciona una inmunidad materna en los lechones, que se prolonga por un periodo de hasta cuatro semanas frente al mismo serotipo contenido en la bacterina (Solano-Aguilar *et al.*, 1999).

Existen informes acerca del control, con éxito, por vacunación con bacterinas comerciales o autovacunas; en otras ocasiones, los resultados han terminado en un fracaso, probablemente debido a la falta de protección cruzada para los serotipos implicados en el proceso clínico. En cualquier caso, no se ha investigado lo suficiente el papel de la inmunidad materna inducida por bacterias en el desarrollo de la infección. Recientemente Rapp-Gabrielson *et al.* (1997), han inmunizado madres con una bacterina comercial que incluía los serotipos 4 y 5, de modo que los cerdos nacidos resistieron el desafío. Los anticuerpos maternos no interferían con la vacunación a la primera y tercera semanas de edad. La protección frente a otras cepas virulentas no siempre resulta evidente en los modelos experimentales. Aunque la protección cruzada es un objetivo primario de

las vacunas comerciales, las autovacunas pueden perder eficacia si están presentes más de una cepa o serotipo, o ha tenido lugar recientemente la introducción de un nuevo serotipo en la explotación. Todo ello permite concluir que se mantiene la duda de que los antígenos protectores puedan ser distintos de los factores de virulencia y/o los antígenos específicos de serotipo (Rapp-Gabrielson *et al.*, 1997).

Rapp—Gabrielson *et al.* (1996, 1997), utilizando una bacterina con os serotipos 4 y 5, han demostrado la eficacia del desafío con diferentes cepas del mismo serotipo, así como protección cruzada frente a otros serotipos heterólogos, aunque en ningún caso la protección fue completa frente a todos los serotipos, ni siquiera frente a los más comunes en América del Norte.

Esto quiere decir que previo al uso de bacterinas se debe tener presente que la mayoría de las granjas tienen más de un serotipo potencialmente causando la enfermedad, que no existe seguridad de que la cepa aislada sea una de las responsables de la enfermedad, además de que algunos aislamientos son deficientes en cuanto a la presencia de factores inmunogénicos protectivos (Rosales, 2001)

Los programas de control pueden incluir vacunación y tratamientos con antibióticos, sin descuidar las prácticas de manejo que tanta incidencia poseen en la creación de situaciones de estrés sobre los animales (Ferri *et al.*, 2000).

1.3 El estudio del PCR y las enfermedades respiratorias.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es considerada hoy en día como una herramienta imprescindible en el laboratorio de Biología Molecular e Ingeniería Genética (Luque y Herráez, 2001).

El objetivo de esta técnica es la amplificación directa de un gen o un fragmento de ADN, o indirecta de un ARN (en este caso, a través de su ADN complementario, (cADN) , presentes en mezclas de muy diversas fuentes, sin necesidad de una purificación previa de la muestra integra original. Se puede partir de homogeneizados, extractos crudos de tejido, sangre completa, mezclas de fragmentos de ADN obtenidos con enzimas de restricción, muestras resultantes de la extracción y aislamiento de ADN. Las aplicaciones de la PCR son muy numerosas y variadas. Como ejemplos, pueden citarse: clonación acelular de fragmentos de ADN, detección de secuencias sin purificación previa, secuenciación de ácidos nucleicos, establecimiento de polimorfismos de secuencia, rastreo de mutaciones, tipificación de ADN para trasplantes, diagnóstico de enfermedades genéticas, prenatales o no, determinación de secuencias específicas de ADN relacionadas con situaciones patológicas definidas, resolución de problemas forenses o arqueológicos, estudios evolutivos, detección de microorganismos infecciosos, detección de células tumorales, amplificación de ADN para su posterior clonación celular (Luque y Herráez, 2001).

En microbiología la PCR se puede utilizar para identificar los microorganismos causantes de enfermedad y es de suma importancia en medicina donde es necesario un diagnóstico rápido. Hoy en día el PCR no se puede considerar como sustituto de la bacteriología clásica. La PCR es inferior en sensibilidad a los métodos clásicos cuando las bacterias tienen crecimiento rápido,

no obstante tiene muchas ventajas al detectar microorganismos de crecimiento lento o cuando la detección se lleva a cabo en muestras contaminadas. Una de las ventajas más evidentes de la técnica de PCR es la rapidez de los resultados y de que se pueden trabajar muchas muestras. Con la bacteriología tradicional se necesitan un mínimo de dos días para alcanzar un diagnóstico certero. Pero en el caso del PCR, solamente se necesitan algunas horas. Por lo tanto las bacterias de lento crecimiento, o bacterias no cultivables, virus, así como hongos, son los mejores candidatos para ser detectados por PCR (Mendoza y Pijoan, 2001).

Muchas técnicas basadas en PCR han sido descritas y se han aplicado en la medicina veterinaria. El diagnóstico rutinario de algunos laboratorios se enfoca en los siguientes microorganismos: *P. multocida* se detecta toxina positiva DNT (+), *M. hyopneumoniae* (nested PCR), *S. suis* y *H. parasuis* (rep-PCR) y PRRSV (Taqman). Estos son los agentes principalmente implicados en el Complejo de la Enfermedad Respiratoria de los Porcinos. Este síndrome es cada vez más importante la causa de una baja productividad de los cerdos, caracterizado por un crecimiento lento, la baja de eficacia alimenticia, anorexia, tos y disnea, donde están involucrados estos microorganismos (Mendoza y Pijoan, 2001).

1.3.1 Secuencias ERIC.

Cuando se realiza un análisis de ADN por métodos genotípicos, se incluyen dentro de este tipo de métodos todos aquellos en los que se estudia directamente la carga genética bacteriana, tanto la cromosómica como la extracromosómica.

Aunque las técnicas aplicadas son similares, suele hacerse una primera distinción entre los estudios centrados sobre plásmidos y los estudios centrados en el ADN cromosómico. En el segundo grupo de técnicas basadas en el análisis de fragmentos amplificados por PCR, se utilizan primers que reconocen secuencias definidas del DNA (Badiola, 2000).

En algunas ocasiones se han amplificado genes conocidos, o determinadas zonas intergénicas, que muestran suficiente capacidad de discriminación epidemiológica entre cepas, al someterse a estudio de los fragmentos obtenidos por la digestión de los productos amplificados con endonucleasas de restricción (Stanley., *et al* 1995).

En otras ocasiones se han utilizado oligonucleótidos que reconocen Secuencias Palindrómicas Extragénicas repetitivas REP, altamente conservadas en eubacterias. Las regiones de ADN amplificadas con esta metodología corresponden a los genes estructurales flanqueados por los primers usados, por lo que puede representar solo una forma indirecta de observación de las variaciones de dichos genes (Versalovic *et al.*, 1991).

Estas secuencias REP parecen jugar un importante papel en la transcripción o en la estabilidad del mRNA y en la interacción del ADN con la DNA polimerasa I (Wilson., *et al* 1990).

La técnica basada en el reconocimiento de las Secuencias Palindrómicas Extragénicas Repetitivas se denomina, genéricamente, REP-PCR "repetitive extragenic palindromic PCR". Existiendo ciertas variaciones, como la que emplea primers que reconocen una subclase de elementos REP presentes en enterobacterias y conocidos como ERIC ("enterobacterial repetitive intergenic consensus" o ERIC) (ver tabla 5) (Vesalovic *et al* 1991).

En 1992 se examinó la distribución de las secuencias Consenso Enterobacterial Repetitivo Intergénico (ERIC) dentro del genoma de una gran número de aislamientos de bacterias gram negativas. Las secuencias ERIC son altamente conservadas en el nivel de secuencia de nucleótido, pero su localización cromosómica difiere entre especies y cepas. Las secuencias ERIC tienen 126 pb y parecen ser restringidas a regiones transcritas del genoma, cualquiera de las dos dentro de regiones intergénicas de operones policistronicos o en regiones no traducibles arriba o debajo de marcos abiertos de lectura (Brujin, 1992).

Tabla 5. Secuencias ERIC.

ERIC Consenso	5'-GTGAATCCCCAGGAGCTTACATAAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'
ERICALL	5'-GTGAATCCCCAGGAGCTTACATAAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' →
ERIC1R	← 3'-CAC TTA GGG GTC CTC GAA TGTA-5'
ERIC2	5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGCG-3' →

Tomado y adaptado de Vesalovic *et al*, 1991

La ERIC-PCR ha mostrado ser eficaz para clasificar bacterias a nivel de especie e incluso para discernir entre cepas con diferentes grados de virulencia. La ERIC-PCR ha resultado ser altamente discriminativa, rápida y sencilla de llevar a la práctica, por lo que se le considera un método muy válido en estudios epidemiológicos (Hu and Totake, 1997)

1.3.2 Secuencias ARN 16s

Recientemente desarrollaron una prueba de PCR que promete una mejor sensibilidad al detectar *Haemophilus parasuis* de muestras clínicas. Este ensayo detecta 10^2 UFC/mL, y se cree es mucho más sensible que el aislamiento tradicional. Una de las principales aplicaciones del método es la definición de la prevalencia de infecciones sistémicas en la pjaras afectadas (Oliveira *et al.*, 2001) (Chang, 2003).

En esta prueba de PCR se compararon las secuencia genética de la subunidad 16s del RNA ribosomal de *H. parasuis* con 56 secuencias 16s de bacterias realcionadas, incluyendo las aisladas con mayor frecuencia en tejidos procedentes de cerdos. Muestras colectadas por hisopos estériles producen resultados en menos de 24 horas. La prueba de PCR es más específica produciendo resultados negativos probados cuando se usaron 15 bacterias comúnmente aisladas de tejido de cerdo (Oliveira *et al.*, 2001).

1.4 Justificación e hipótesis.

1.4.1 Justificación.

La actividad porcina en México durante los últimos años ha presentado un importante desarrollo como resultado de trabajar cada vez más sistemas intensivos de producción, así como a la adopción de nuevas tecnologías provenientes de otros países (Quiles, 2001). En esta moderna industria porcina, algunos procesos infecciosos de origen bacteriano cursan con inflamación de las meninges. Debe mencionarse especialmente la infección por *Haemophilus parasuis* que es el causante de la enfermedad de Glässer. Se considera, en la actualidad, uno de los problemas emergentes porcinos de mayor interés económico y científico, asociado a determinadas prácticas de manejo ligadas a explotaciones calificadas como "excelentes" desde el punto de vista sanitario, incluyendo explotaciones SPF (libres de patógenos específicos) o, simplemente, de alto estatus sanitario. En este tipo de granjas la enfermedad aparece de forma fulminante, con muertes súbitas que, en ocasiones, adquieren niveles preocupantes.

Probablemente, la coincidencia con nuevos síndromes respiratorios en los que se implican otras bacterias o virus ha contribuido de modo decisivo al incremento de la prevalencia y gravedad de la enfermedad. (Ferri *et al.*, 2000). Por eso el estudio de la epidemiología en las piaras es muy importante. Técnicas como la ERIC-PCR han mostrado resultados muy útiles porque identifica cepas individuales, aún del mismo serotipo. En estos estudios han demostrado que la mayoría de los brotes de la enfermedad en granjas son debidos a una sola cepa y que existe transmisión de estas cepas entre granjas (Mendoza *et al.*, 1999). Para el caso de México se necesita saber si el *Haemophilus parasuis* tiene el mismo comportamiento dentro de las granjas, ya que sería de gran ayuda, para este sector, establecer el diagnóstico por ERIC-PCR para el control de la enfermedad de Glässer.

1.4.2 Hipótesis.

Si logramos estandarizar la técnica de PCR con los oligonucleótidos ERIC y Hps para el diagnóstico de la enfermedad de Glässer entonces podremos estudiar el comportamiento de las cepas de *Haemophilus parasuis* dentro de las granjas.

2. OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la técnica de ERIC-PCR mediante la obtención de muestras de campo positivas a *Haemophilus parasuis* para la detección temprana de la enfermedad de Glässer y estandarizar la técnica.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

Aislar *Haemophilus parasuis* de muestras de pulmón, líquido cefalorraquídeo y cornetes nasales de cerdo.

Establecer el diagnóstico de *Haemophilus parasuis* mediante la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos ERIC 1-R y ERIC 2.

Evaluar la especificidad de la técnica ERIC-PCR para la detección de *Haemophilus parasuis* utilizando otras cepas bacterianas del tracto respiratorio de los cerdos.

Comparar los iniciadores ERIC-1R y ERIC 2 con los oligonucleótidos de Hps-R y Hps-F para el diagnóstico de la enfermedad de Glässer.

3. Material y métodos.

3.1 Obtención de una cepa de *Haemophilus parasuis*.

La cepa de *Haemophilus parasuis* se obtuvo del laboratorio de Virología y Microbiología, Coordinación General de Estudios de Posgrado FES Cuautitlán, Campo 1. Está descrita como una cepa de *Haemophilus parasuis* serotipo 5 Nagasaki.

El cultivo de la cepa se realiza en medio de cultivo agar PPLO con una estría de *Staphylococcus aureus* Cowan I y se incuba 24 horas a 37°C. Posteriormente se toman las colonias cercanas a la estría y se siembran en cultivo agar enriquecido PPLO con levadura. Una vez obtenida la bacteria se le realizó tinción de Gram y las pruebas bioquímicas ureasa, catalasa y oxidasa.

Parte del crecimiento bacteriano se coloca en Skilmilk y se guarda a -70°C para preservarlo. La otra parte de este cultivo se cosecha en PBS para la extracción de ADN.

3.2 Estandarización de la extracción de ADN de *Haemophilus parasuis* por el método Fenol-Cloroformo.

Con la cepa obtenida se inició el trabajo experimental empleando la técnica referida por Ruiz *et al* (2001) para la extracción de ADN para *Haemophilus parasuis*. A esta técnica se realizaron algunas modificaciones para utilizarla en el presente trabajo.

Se cultivo en agar PPLO con levadura y se cosecha en PBS, se coloca 1.0 mL de PBS en tubos eppendorf de 1.5mL. Se centrifugo en una microcentrifuga Beckman Microfuge E™ por 5 minutos a 14,000 rpm. Posteriormente se resuspendió el sedimento en 400 µL de PBS y se colocó el tubo en agua hirviendo durante 10 minutos. A continuación se agregaron 250 µL de fenol isoamil cloroformo, se mezcló bien y se centrifugó durante 2 minutos a 14,000 rpm. La capa superior se colocó en otro tubo eppendorf de 1.5 mL y se le añadieron 250 µL de isoamil cloroformo mezclándolo 40X, después se centrifugó 2 minutos a 14,000 rpm. Se obtuvo la capa superior en un tubo eppendorf de 0.5 mL y se agregó 12 µL de acetato de sodio y 400 µL de etanol al 100%, la mezcla se deja en hielo 45 minutos. Pasado este tiempo se centrifugó 15 minutos a 14,000 rpm. Se decanto el alcohol y se agregaron 70 µL de etanol al 70% sin resuspender. Después se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm. Por último se decanto el alcohol y se dejó secar. El ADN se resuspende en 50 µL de agua miliQ y se almacena a 4°C.

3.3 Estandarización de la técnica ERIC-PCR.

En el presente estudio para la identificación de *Haemophilus parasuis* con la prueba de reacción en cadena de la polimerasa de secuencias consenso enterobacterial repetitivo intergénico (ERIC) se utilizaron 2 oligonucleótidos, adquiridos de la empresa XXIDT® D.Walek y se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados.

ERIC-1R	5' - ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCAC-3'
ERIC-2	5' - AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGCG-3'

Para la reacción fueron usados 9 μL de la suspensión de ADN molde, Buffer QUIAGEN® a una concentración final de 1X, 2.5mM de MgCl_2 , 200 μM de cada dNTP, 0.4 μM de cada oligonucleótido, 8.5 μL de agua miliQ y 1U de Taq DNA polimerasa. El volumen total de la reacción fue de 25 μL .

También se realizó una variación de esta técnica utilizando una solución Q QUIAGEN®, esta solución fue empleada en sustitución de los 2.5mM de MgCl_2 . De esta manera se optimizó la reacción y se obtuvieron mejores resultados.

Las reacciones fueron corridas en un termociclador Techne modelo Progene™ durante 30 ciclos con los siguientes pasos:

- Desnaturalización a 94°C por 0.5 minutos.
- Alineamiento a 40°C por 2 minutos.
- Extensión a 72°C por 2 minutos.

Con una Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Alícuotas de 5 μL de la muestra amplificada fueron cargadas sobre un gel de agarosa al 2% con 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Bromuro de etidio corrido a 80v por 60 minutos.

Los gels fueron visualizados y fotografiados usando el transiluminador GENE GENIUS Bioimaging System .

3.4 Obtención de cepas de *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 2.

Las cepas de *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 2 se obtuvieron de aislamientos de casos clínicos de campo realizados por el laboratorio de Virología y Microbiología, Coordinación General de Estudios de Posgrado FESC-1.

El cultivo de la cepa de *Streptococcus suis* se llevó a cabo en medio de Agar Sangre ya que la bacteria es Beta hemolítica, también se observó al microscopio que se trataba de una bacteria en forma de cocos Gram positiva.

La cepa de *Pasteurella multocida* fue cultivada en medio Agar BHI y se le realizaron las pruebas de Indol, Urea, Nitratos, OF y Gram. Para *Bordetella bronchiseptica* se utilizó medio Agar BHI y Agar Sangre.

Para *Actinobacillus pleuropneumoniae* se realizó el cultivo en Agar BHI y Agar Sangre con una estría de cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* Cowan I. Las colonias cercanas a la estría se resiembran en BHI con levadura.

Todas las cepas bacterianas se incubaron por un periodo de 24 horas a una temperatura de 37°C.

3.4.1 Extracción de ADN de cepas bacterianas.

Después de obtener las cepas de *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 2, se realizaron las extracciones de ADN de cada una de las bacterias. La extracción de ADN se llevó a cabo por el método estandarizado y bajo las mismas condiciones en las cuales se realizó la extracción de *Haemophilus parasuis*.

3.5 Prueba de especificidad.

Para esta prueba se utilizaron cada una de las extracciones de las bacterias y se preparó la mezcla de reacción para la ERIC-PCR. Para la reacción fueron usados 9 μL de la suspensión de ADN molde de cada bacteria, Buffer QUIAGEN® a una concentración final de 1X, Solución Q QUIAGEN® 1X, 200 μM de cada dNTP, 0.4 μM de cada oligonucleótido, 8.5 μL de agua miliQ y 1U de Taq DNA polimerasa. Se tomaron alícuotas de 5 μL de cada uno de los productos amplificados y se cargaron en gel de agarosa al 2% con 0.5 mg/mL de bromuro de etidio a 80V por 60 minutos.

3.6 Muestreo.

Como *Haemophilus parasuis* se puede aislar de sitios respiratorios y sistémicos, el muestreo para el aislamiento de cepas de esta bacteria se llevo a cabo de tres sitios de la anatomía del cerdo. Los sitios fueron: pulmón, líquido cefalorraquídeo y cornetes nasales.

3.6.1 Muestreo en pulmones.

Se tomaron muestras de 20 pulmones de cerdos que llegaron al laboratorio de diferentes granjas de México. Los pulmones eran de cerdos con sospecha de posible infección por *Haemophilus parasuis*. Con pinzas y tijeras de disección estériles se le realiza un corte profundo al pulmón en la zona donde se localiza la parte afectada (fig 3). Posteriormente con el tejido se hace una impronta en el medio Agar PPLO, se siembra el agar de forma masiva y se coloca la estría de *Staphylococcus aureus* Cowan I, las cajas se incuban durante 24 horas a 37°C. Las colonias cerca de la estría que realizaron satelitismo son cultivadas en Agar PPLO con extracto de levadura.



Figura 3. Muestreo en pulmón.

3.6.2 Muestreo en líquido cefalorraquídeo.

Las muestras de Líquido cefalorraquídeo llegaron al laboratorio procedentes de dos granjas de los estados de Sonora y Puebla. Las muestras llegaron en tubos y se procedió a tomar un inculo de cada uno de los 25 tubos como se muestra en la figura 4. El inculo fue colocado en medio Agar PPLO el cual fue sembrado de forma masiva, con la respectiva estría de *Staphylococcus aureus* Cowan I y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las colonias cerca de la estría que realizan satelitismo son cultivadas en Agar PPLO con extracto de levadura.



Figura 4. Muestreo en Líquido cefalorraquídeo.

3.6.3 Muestreo en cornetes nasales.

El muestreo de cornetes nasales de cerdo se llevo a cabo en el Centro de Enseñanza e Investigación en Producción Porcina de la Facultad de Veterinaria de la UNAM en Jilotepec Estado de México. Se muestrearon 37 cerdos de las áreas de maternidad y destete, también se tomo muestra de cerdos pelones mexicanos que es una raza mexicana que por el bajo consumo de su carne está en peligro de extinción. El muestreo se realizó inmovilizando al animal y tomando exudados de las fosas nasales con hisopos estériles, los cuales se colocaron en tubos con caldo PPLO como medio de transporte (fig. 5). Los tubos con las muestras fueron transportados en una caja con refrigerantes. A la llegada al laboratorio se procedió a colocar improntas de las muestras de cornetes nasales con los hisopos en cajas petri con Agar PPLO, se sembraron de forma masiva y se les coloco la estría de *S. aureus*.

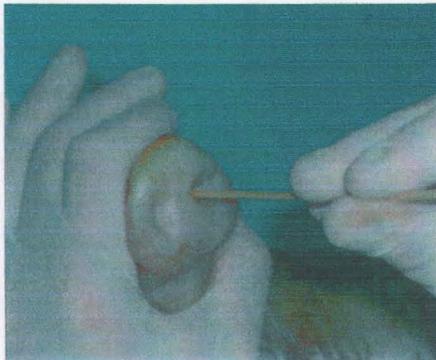


Figura 5. Muestreo en cornetes nasales de cerdo.

3.7 Prueba de ERIC-PCR con las muestras obtenidas.

Con las extracciones que fueron hechas a las cepas aisladas de pulmones se llevo a cabo la ERIC-PCR, de cada extracción se tomaron 9 μ L de la suspensión con ADN. La mezcla de reacción, la amplificación y el corrimiento de las muestras en gel se realizaron de la forma ya antes descrita para esta técnica.

En el caso de las muestras de líquido cefalorraquídeo se tomo de cada una de ellas un inculo de 50 μ L, el cual fue centrifugado a 14,000 rpm durante 5 minutos, el botón fue resuspendido en PBS y se realizó la extracción con el método Fenol-cloroformo. De estas extracciones se tomaron 9 μ L de la suspensión con ADN para la mezcla de reacción para la amplificación por el método ERIC-PCR.

Para las muestras de cornetes nasales, también se realizó una extracción directa de los hisopos. Los hisopos se colocaron en un tubo Eppendorf con PBS y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 minutos, el botón se resuspendió nuevamente en PBS y a continuación se procedió a realizar la extracción con Fenol-cloroformo. Las muestras fueron amplificadas siguiendo la metodología de ERIC-PCR.

3.8 Estandarización de la PCR con los iniciadores Hps R y Hps F.

En el presente trabajo también se utilizó una prueba de PCR desarrollada por Oliveira *et al.*, 2001, para amplificar la región que codifica para la subunidad 16s del RNA ribosomal de *Haemophilus parasuis* y comparar los resultados con los obtenidos mediante el método de ERIC-PCR. Los oligonucleótidos utilizados fueron adquiridos de la empresa XXIDT® D.Walek y se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 7. Oligonucleótidos Hps.

Hps-R	5' - GGC TTC GTC ACC CTC TGT-3'
Hps-F	5' -GTG ATG AGG AAG GGT GGT GT-3'

Para la reacción fueron usados 3 µL de la suspensión de ADN molde de *Haemophilus parasuis*, Buffer QUIAGEN® a una concentración final de 1X, solución Q QUIAGEN®, 200 µM de cada dNTP, 0.4 µM de cada oligonucleótido, 14.5 µL de agua miliQ y 1U de Taq DNA polimerasa. El volumen total de la reacción fue de 25 µL.

La reacción fue corrida en un termociclador Techne Progene™ durante 30 ciclos con los siguientes pasos:

- Desnaturalización a 94°C por 0.5 minutos.
- Alineamiento a 59°C por 0.5 minutos.
- Extensión a 72°C por 2 minutos.

Con una Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Se tomaron alícuotas de 5 µL de la muestra amplificada fueron cargadas sobre un gel de agarosa al 2% con 0.5 µg/mL de Bromuro de etidio corrido a 80V por 60 minutos. Los geles realizados con esta técnica fueron visualizados y fotografiados usando el transiluminador GENE GENIUS Bioimaging System .

3.9 Detección de *Haemophilus parasuis* con oligonucleótidos *Hps*.

Las extracciones de ADN hechas tanto a las cepas de *Haemophilus parasuis* aisladas de 3 sitios diferentes (pulmón, LCR y cornetes nasales) como las extracciones realizadas directamente de las alícuotas de LCR y de los hisopos nasales, fueron sometidas a la amplificación por PCR con los oligonucleótidos Hps-R y Hps-F con la técnica descrita anteriormente en el apartado 3.11.

4. RESULTADOS.

La extracción de ADN de la cepa de *Haemophilus parasuis* serotipo 5 de Nagasaki fue utilizada con éxito para estandarizar la técnica de ERIC-PCR. El ADN molde de esta cepa nos sirvió como control positivo para todas las pruebas de PCR realizadas durante el estudio. En la figura 6 se muestran los resultados de amplificación cuando se utilizan diferentes concentraciones de $MgCl_2$, pero se obtiene una mejor definición de los fragmentos amplificados cuando se agrega en lugar del magnesio una solución con el nombre "Q solution" proporcionada por el proveedor QUIAGEN. Esta solución fue empleada para todas las mezclas de reacción preparadas para PCR. La reproducibilidad de la técnica ERIC-PCR fue buena, debido a que primero se realizó la estandarización de la extracción de ADN y que las concentraciones de los reactivos fueron las adecuadas para llevar a cabo las reacciones.

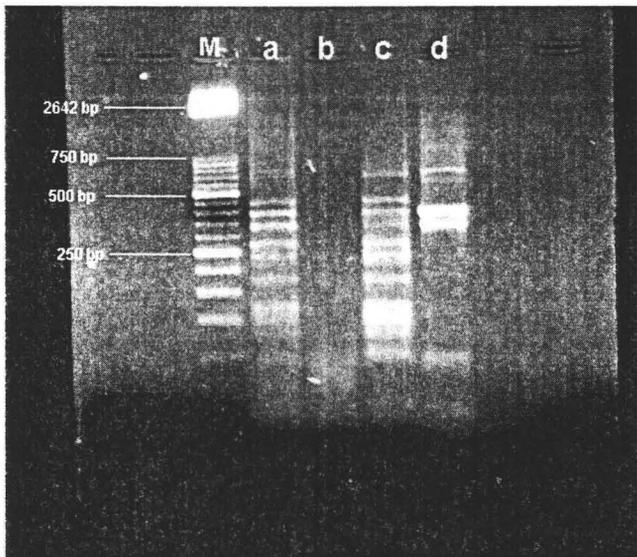


Figura 6. Estandarización de la técnica ERIC-PCR. **M**, marcador MXIII; **a**, producto de amplificación de *H. parasuis* con $2.5\mu M$ de $MgCl_2$; **b**, control negativo; **c**, producto de amplificación de *H. parasuis* con $5.0\mu M$ de $MgCl_2$; **d**, producto de amplificación de *H. parasuis* con solución Q QUIAGEN® 1x.

Los oligonucleótidos ERIC 1R y ERIC2 no muestran especificidad para la detección del *Haemophilus parasuis*, es decir que no solo amplifica muestras de ADN molde de esta bacteria Gram negativa sino que también lo hacen con las muestras de otras cepas representativas del tracto respiratorio del cerdo. Sin embargo muestras obtenidas de los productos de amplificación de cada una de las cepas bacterianas expuestas si mostraron un bandeo selectivo (fig 7).

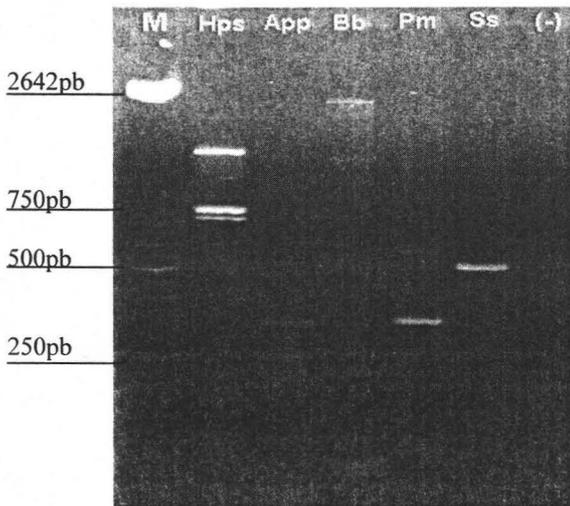


Figura 7. Prueba de especificidad de la técnica ERIC-PCR. **M**, marcador MXIII; **Hps** Control positivo producto de amplificación de *H. parasuis*; **App**, producto de amplificación de *A. pleurpneumoniae*; **Bb**, producto de amplificación *B. bronchiseptica*; **Pm**, producto de amplificación de *P. multocida*; **Ss**, producto de amplificación de *S. suis*; **(-)**, control negativo.

En cambio cuando se corrieron las muestras amplificadas de PCR con los oligonucleótidos Hps si se obtuvo una sola banda de aproximadamente 821 pb para *Haemophilus parasuis* (fig. 8). Ninguna de las muestras de ADN de las cepas de *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida* y *S.suis* fueron amplificadas con esta prueba de PCR.

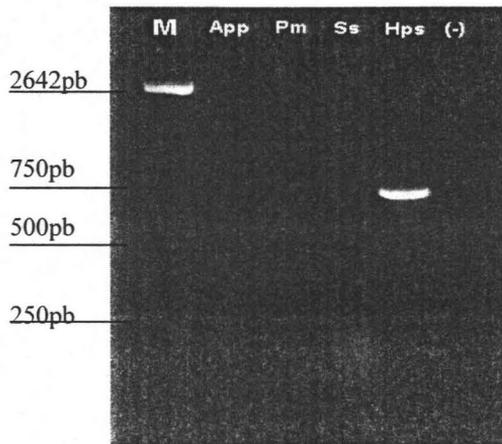


Figura 8. Prueba de especificidad de los oligonucleótidos Hps-Ry Hps-F. **M**, marcador MXII; **App**, producto de amplificación de *A. pleurpneumoniae*; **Pm**, producto de amplificación de *P. multocida*; **Ss**, producto de amplificación de *S. suis*; **Hps**, control positivo producto de amplificación de *H. parasuis*; **(-)**, control negativo

Con respecto al muestreo, se logró el aislamiento de 3 cepas de *Haemophilus parasuis* de los 20 pulmones muestreados (Tabla 8). En la figura 9 se muestra una cepa de *Haemophilus parasuis* aislada de pulmón. La identificación primaria de las cepas se realizó con la prueba de Gram y las pruebas bioquímicas de ureasa, catalasa y oxidasa. Los resultados de estas pruebas nos indicaron que se tenía a la bacteria pura. Las cepas eran cocobacilos Gram (-), sin actividad de ureasa, y positivas a la prueba de catalasa y oxidasa. Posteriormente a la identificación se completo la extracción de ADN de las 3 cepas y con estas se llevo a cabo la ERIC-PCR.



Figura 9 . Aislamiento de *Haemophilus parasuis*. Crecimiento en medio Agar PPLO con estria de *S. aureus* Cowan I.

Tabla 8. Aislamientos de *Haemophilus parasuis* de pulmones de cerdo.

No. muestra	Granja	Cerdo	Aislamiento de <i>Haemophilus parasuis</i> .
1	Los amigos C.d. Obregón.	Cerdo 3	-
2	Los amigos C.d. Obregón	Cerdo 5	-
3	Los amigos C.d. Obregón	Cerdo 6	-
4	Puebla	Cerdo con 12 semanas sin medicar.	+
5	AMTEC Occidente.	Lechón 36 días.	-
6	AMTEC Occidente.	Lechón 36 días.	-
7	Granja Rosita.	Cerdo 78 días.	-
8	Alfredo Franco.	Cerdo 45d.	-
9	Alfredo Franco.	Cerdo 37d.	-
10	Alfredo Franco.	Cerdo 53d.	-
11	Alfredo Franco.	Cerdo 61d.	+
12	Grupo Soles Sonora.	Lechón 1.	-
13	Grupo Soles Sonora.	Lechón 4.	+
14	Melchor Ocampo.	Lechón 8 semanas.	-
15	Zapotlanejo Jalisco	Lechón 1 9 semanas.	-
16	Zapotlanejo Jalisco	Lechón 2 10 semanas.	-
17	Zapotlanejo Jalisco	Lechón 3 9 semanas	-
18	Jilotepec	Cerdo 12ME	-
19	Jilotepec	Destete 19	-
20	Jilotepec	Destete 22	-

En el caso de las muestras de líquido cefalorraquídeo no se obtuvo ningún aislamiento de la bacteria *Haemophilus parasuis* (Tabla 9). Sin embargo se sabía que aunque no se logró el aislamiento de la bacteria, esta puede estar presente y se puede comprobar con otras técnicas como por ejemplo la Inmunofluorescencia Directa. De esta manera se procedió a las extracciones de ADN directamente de las muestras de LCR, las cuales se completaron de manera exitosa y con estas se consiguió identificar 4 muestras positivas con los métodos de PCR.

Tabla 9. Aislamientos de *Haemophilus parasuis* de Líquido cefalorraquídeo.

No. muestra	Granja	Cerdo	Aislamiento de <i>Haemophilus parasuis</i> .
1	Sonora	C7 8 semanas Gpo.38	-
2	Sonora	LCR #3	-
3	Sonora	C8 7 semanas Gpo. 39	-
4	Sonora	LCR #6	-
5	Sonora	C8 8 semanas Gpo.39	-
6	Sonora	C9 7 semanas Gpo.39	-
7	Sonora	C9 7 semanas Gpo.39	-
8	Sonora	C3 78 días	-
9	Sonora	C5	-
10	Sonora	C3	-
11	Sonora	C4 78 días	-
12	Sonora	C1 36 días	-
13	Sonora	C2 26 días	-
14	Tehuacan, Puebla	LCR-7b	-
15	Tehuacan, Puebla	LCR-7a	-
16	Tehuacan, Puebla	LCR-5	-
17	Tehuacan, Puebla	LCR-5b	-
18	Tehuacan, Puebla	LCR-9a	-
19	Tehuacan, Puebla	LCR-9b	-
20	Tehuacan, Puebla	LCR-3b	-
21	Tehuacan, Puebla	LCR-7a	-
22	Tehuacan, Puebla	LCR-9b	-
23	Tehuacan, Puebla	LCR-7b	-
24	Tehuacan, Puebla	LCR-3a	-
25	Tehuacan, Puebla	LCR-1a	-

Del muestreo de cornetes nasales solo se consiguió un aislamiento (Tabla 10). La cepa se identificó de la misma forma que las 3 cepas aisladas de pulmón. A cada uno de los hisopos con los que se muestreo los cornetes nasales de los cerdos se les trato para obtener la extracción de ADN resultando eficiente la metodología empleada ya que se obtuvieron productos de PCR de 7 muestras.

Tabla 10. Aislamiento de *Haemophilus parasuis* de muestras de cornetes nasales de cerdos.

No. muestra	Granja	Cerdo	Aislamiento de <i>Haemophilus parasuis</i>
1	Jilotepec	S-1	-
2	Jilotepec	S-2	-
3	Jilotepec	S-3	-
4	Jilotepec	S-4	-
5	Jilotepec	S-5	-
6	Jilotepec	S-6	+
7	Jilotepec	S-7	-
8	Jilotepec	S-8	-
9	Jilotepec	S-9	-
10	Jilotepec	S-10	-
11	Jilotepec	Destete 1-1	-
12	Jilotepec	Destete 1-3	-
13	Jilotepec	Destete 1-4	-
14	Jilotepec	Destete 1-5	-
15	Jilotepec	Destete 1-6	-
16	Jilotepec	Destete 1-7	-
17	Jilotepec	Destete 1-8	-
18	Jilotepec	Destete 1-9	-
19	Jilotepec	Destete 1-10	-
20	Jilotepec	M574 -1	-
21	Jilotepec	M571-2	-
22	Jilotepec	M504-1	-
23	Jilotepec	M504-2	-
24	Jilotepec	M504-3	-
25	Jilotepec	M508-1	-
26	Jilotepec	74ME	-
27	Jilotepec	10M	-
28	Jilotepec	72M	-
29	Jilotepec	71M	-
30	Jilotepec	12ME	-
31	Jilotepec	11M	-
32	Jilotepec	75ME	-
33	Jilotepec	73M	-
34	Jilotepec	70M	-
35	Jilotepec	8P	-
36	Jilotepec	E2	-
37	Jilotepec	9PE	-

De las 3 muestras de ADN obtenidas de cepas de *Haemophilus parasuis* aisladas de pulmón se obtuvieron 2 perfiles de huellas de ADN diferentes (fig.10). La cepa de *Haemophilus parasuis* aislada del pulmón de la granja Franco produjo múltiples fragmentos, dos de ellos entre las 750 pb y dos más por debajo de los 250 pb. Las cepas obtenidas de Puebla y Sonora muestran patrones muy similares entre ambas, incluso muy parecidos al patrón mostrado por el control positivo de *Haemophilus parasuis* serotipo 5 de Nagasaki.

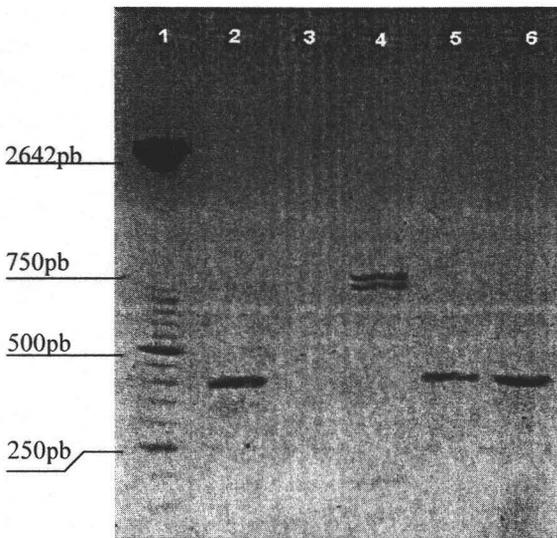


Figura 10. Perfiles de fragmentos de ADN amplificados con ERIC-PCR de muestras de pulmón. **1**, marcador MXIII; **2**, control (+) producto de amplificación de *H. parasuis* serotipo 5 Nagasaki; **3**, control (-); **4**, producto de amplificación de *H. parasuis* aislado del pulmón 13; **5**, producto de amplificación de *H. parasuis* aislado del pulmón 11; **6**, producto de amplificación de *H. parasuis* aislado del pulmón 4.

Las 3 cepas aisladas de pulmón con sospecha de infección por *Haemophilus parasuis* fueron positivas a la prueba de PCR con oligonucleótidos *Hps*. En la figura 11 se pueden observar los fragmentos de amplificación de aproximadamente 821 pb que corresponden a la región que codifica para la subunidad pequeña 16s del ARN ribosomal.

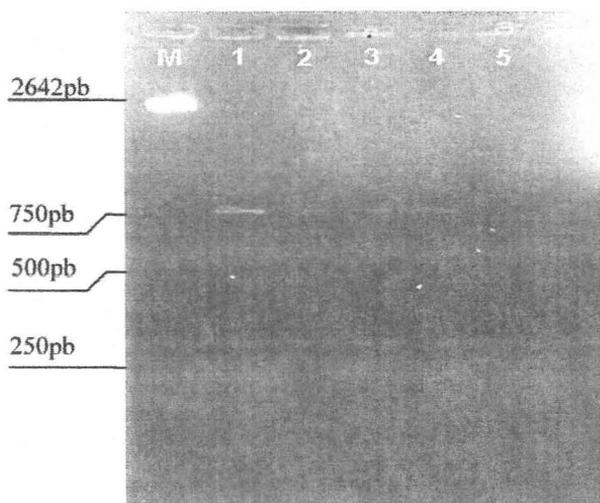


Figura 11. Fragmentos de ADN amplificados con oligonucleótidos *Hps*-R y *Hps*-F de muestras de pulmón. **M**, marcador MXIII; **1**, control (+) producto de amplificación de *H. parasuis* serotipo 5 Nagasaki; **2**, producto de amplificación de *H. parasuis* aislado del pulmón 13; **3**, producto de amplificación de *H. parasuis* aislado del pulmón 11; **4**, producto de amplificación de *H. parasuis* aislado del pulmón 4; **5**, control (-).

Debido a que no se logro aislar ninguna cepa de *Haemophilus parasuis* de las muestras de líquido cefalorraquídeo, las 25 muestras de la extracción directa de ADN fueron sometidas a PCR para amplificar la región que codifica para la subunidad 16s del RNA ribosomal. De un total de 25 muestras de ADN obtenidas del LCR cuatro dieron positivo a *Haemophilus parasuis* lo cual indica la presencia de esta bacteria incluso cuando no se llega obtener el aislamiento (fig 12).

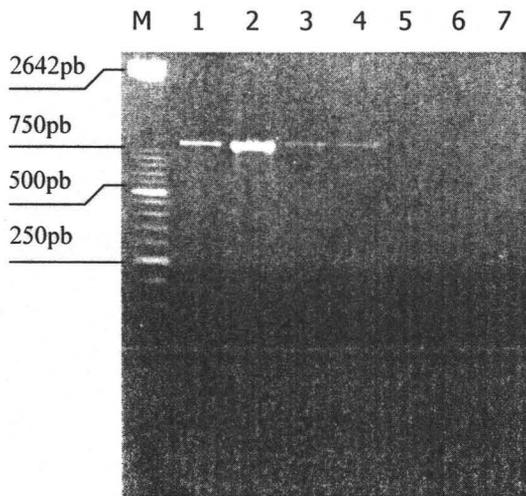


Figura 12. Fragmentos de ADN amplificados con oligonucleótidos Hps-R y Hps-F de muestras de líquido cefalorraquídeo. **M**, marcador MXIII; **1**, control (+) producto de amplificación de *H. parasuis* serotipo 5 Nagasaki; **2**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de LCR No 7; **3**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de LCR No 13; **4**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de LCR No 14; **5**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de LCR No 14; **6**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de LCR No 20; **7**, control (-).

Con las 4 muestras positivas a *Haemophilus parasuis* con los oligonucleótidos Hps-R y Hps-F se realizó la técnica de ERIC-PCR (fig. 13). Se obtuvieron 2 perfiles de fragmentos diferentes. Dos fragmentos por debajo de los 250 pb se obtuvieron de los productos de amplificación de las muestras de LCR 7, 14 y 20. La muestra de LCR 13 presentó un patrón de huellas genómicas diferente con fragmentos superiores a las 250 pb.

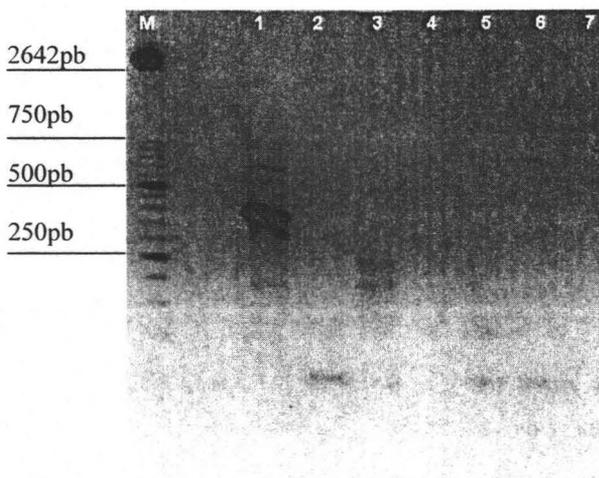


Figura 13. Perfiles de fragmentos de ADN amplificados con ERIC-PCR de muestras de líquido cefalorraquídeo. **M**, marcador MXIII; **1**, control (+) producto de amplificación de *H. parasuis* serotipo 5 Nagasaki; **2**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de LCR No 7; **3**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de LCR No 13; **4**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de LCR No 14; **5**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de LCR No 14; **6**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de LCR No 20; **7**, control (-).

En consecuencia a que solo se logró el aislamiento de una cepa de *Haemophilus parasuis* de cornetes nasales de cerdo, a todas las extracciones de las 37 muestras se les realizó la prueba de PCR con oligonucleótidos Hps. En la Figura 14 se puede observar 8 muestras fueron positivas a *Haemophilus parasuis* ya que se amplificó el fragmento correspondiente a 821 pb.

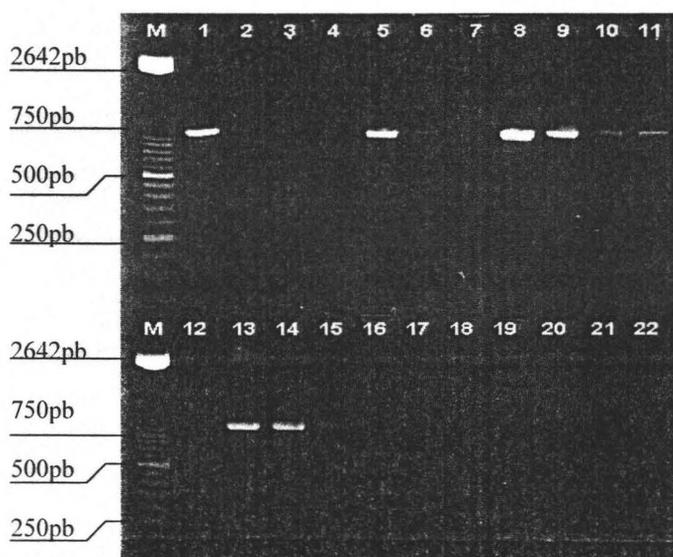


Figura 14. Fragmentos de ADN amplificados con oligonucleótidos Hps-R y Hps-F de muestras de cornetes nasales. **M**, marcador MXIII; **1**, control (+) producto de amplificación de *H. parasuis* serotipo 5 Nagasaki; **2**, control (-); **5**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 3; **6**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 4; **8**, producto de amplificación de ADN del aislamiento de *H. parasuis* de la muestra 6; **9**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 7; **10**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 8; **11**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 9; **13**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 11; **14**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 12; **3,4,7,12,15,16,17,18,19,20,21,22** correspondientes a las muestras que no amplificaron.

El ADN de las muestras 3, 6, 8, 9, 11 y 12 (extraído directamente de hisopos de cornetes nasales) incluyendo también el ADN de la muestra 7 el cual es de la cepa aislada, produjeron múltiples fragmentos de amplificación (fig 15). Los patrones de huellas genómicas son similares entre las muestras 6, 9, 11 y 12. En el caso de la muestra 7 presenta fragmentos por arriba de las 750 pb lo que indica una diferencia entre los otros productos de amplificación. La muestra 3 solo produjo una sola banda entre las 250 y 500 pb por lo que hace no tenga relación con los fragmentos obtenidos en la otras muestras.

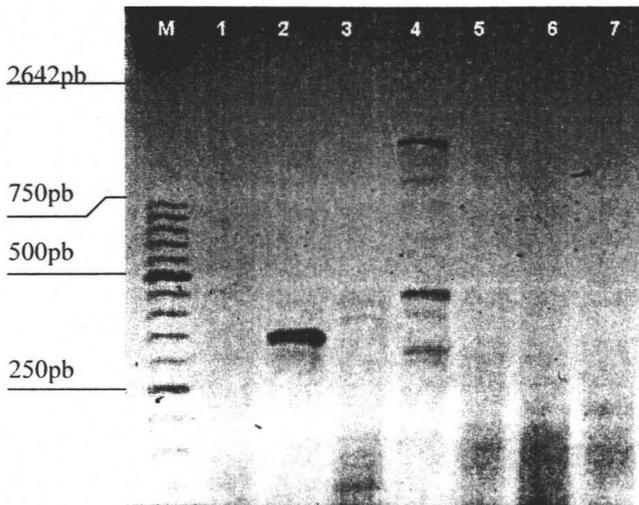


Figura 15. Perfiles de fragmentos de ADN amplificados con ERIC-PCR de muestras de cornetes nasales. **M**, marcador MXIII; **1**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 8 ; **2**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de muestra 3; **3**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 6; **4**, producto de amplificación de ADN del aislamiento de *H. parasuis* de la muestra 7; **5**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 9; **6**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 11; **7**, producto de amplificación de ADN de *H. parasuis* extraído directamente de la muestra 12.

5. Discusión.

Este estudio se desarrolló como primera aplicación práctica de ERIC-PCR para evaluar la variabilidad de aislamientos de *Haemophilus parasuis* en México. Una de las finalidades del trabajo fue estandarizar la técnica de ERIC-PCR para ser reproducida en futuros estudios sobre la afección de pjaras por la infección de *Haemophilus parasuis*. Esta estandarización se llevo a cabo de manera exitosa y con la metodología empleada podemos decir que cualquier brote de infección en granjas de México ocasionada por la bacteria *Haemophilus parasuis*, puede ser estudiado en el laboratorio para determinar la estrategia a seguir para controlar la enfermedad de Glässer.

La técnica de ERIC-PCR no es específica para amplificar únicamente muestras de ADN de *Haemophilus parasuis* sino que es una prueba con la cual se pueden amplificar secuencias primariamente de bacterias entéricas Gram-negativas. Versalovic *et al* (1991) demostraron por primera vez que existen secuencias ERIC-like en eubacterias y que tanto los elementos REP y ERIC han sido altamente conservados en el reino de eubacterias por cientos de millones de años.

De acuerdo a esto la prueba de ERIC-PCR realizada para comparar a *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae*, *P. multocida*, *B. bronchiseptica* y *S. suis* produjo fragmentos amplificados de todas estas especies; sin embargo debido a que los oligonucleótidos ERIC-1R y ERIC-2 permiten la directa generación de especies sin ambigüedad y huellas genómicas de cepas-específicas, se logro encontrar diferencias entre las diversas especies bacterianas estudiadas.

Los resultados obtenidos del muestreo de cornetes nasales y líquido cefalorraquídeo no fueron los esperados, pues solo se consiguió un aislamiento. La bacteria *Haemophilus parasuis* es de naturaleza fastidiosa y su aislamiento es complicado. No siempre se puede lograr el primer aislamiento en Agar PPLO con estría de *S. aureus* Cowan I, sino que es conveniente combinar el cultivo de las muestras en Agar PPLO y Agar Sangre con la respectiva estría, incluso también combinar las condiciones de incubación con ambiente aerobio y microaerofílico.

Para obtener el aislamiento de una cepa de *Haemophilus parasuis* se necesitan cuidar las condiciones de crecimiento, de esta manera disminuyen las probabilidades de lograr dicho aislamiento, esto lo comprobamos porque al tener 82 muestras de pulmones, líquido cefalorraquídeo y cornetes nasales, solo se obtuvieron cepas puras a partir de 4 muestras.

Debido al bajo porcentaje de aislamientos se optó por realizar las extracciones de ADN directamente de las muestras de líquido cefalorraquídeo y de los hisopos nasales. Aunque para realizar la técnica de ERIC-PCR se recomienda tener el aislamiento de la bacteria, se completaron las extracciones y muchas de estas resultaron positivas a *Haemophilus parasuis*. Méndez y Trigo (1996) afirman que la presencia de contaminantes en tejido, pero no en fluidos, refuerza la oportunidad de obtener el aislamiento primario de las muestras de fluidos. Con esto la probabilidad de haber realizado extracciones contaminadas con diferentes bacterias en una misma muestra de líquido cefalorraquídeo es mínima.

El uso de hisopos con medio de transporte comercial muestran puede mantener viables los aislamientos de *Haemophilus parasuis* durante 7 días a temperatura ambiente (Méndez-Trigo, 1996) mejoran el porcentaje de aislamientos de campo.

La técnica ERIC-PCR fue discriminativa para la caracterización y comparación de cepas. El ERIC-PCR detectó diferentes genotipos entre aislamientos, para los aislamientos de pulmón se encontraron dos patrones diferentes y uno de ellos muy semejante al patrón de huellas genómicas presentado por el control positivo *Haemophilus parasuis* serotipo 5. También en las muestras de líquido cefalorraquídeo se encontraron dos patrones diferentes, mientras que las huellas genómicas encontradas en las muestras de cornetes nasales presentan 3 tipos de perfiles de ADN diferentes.

Los patrones fueron variables entre los sitios anatómicos del aislamiento; sin embargo, dentro de cada uno de los sitios ya sea sistémico o respiratorio se repiten algunos patrones. Dentro de los perfiles de aislamientos de pulmón se presentan dos muy semejantes y que son de diferentes granjas y estados. Ruiz *et al* (2001), realizó un estudio donde se presentan comportamientos similares, en donde perfiles de ADN encontrados en aislamientos neumónicos, fueron remarcadamente semejantes uno al otro, aunque estos fueron aislados de diferentes granjas y regiones.

La evaluación de huellas genómicas en algunos trabajos muestran que los aislamientos sistémicos y respiratorios tienden a ser colocados en distintos grupos de genotipos, indicando los aislamientos virulentos pueden ser relacionados clonalmente. No se encontró relación directa entre los patrones de huellas genómicas obtenidos entre las cepas de las diferentes muestras de pulmón, LCR y cornetes nasales. Pero también es coincidente que los perfiles de ADN de aislamientos neumónicos son más homogéneos y más similares que los perfiles de ADN obtenidos de sitios sistémicos.

El uso de ERIC-PCR puede permitir el estudio de la epidemiología dentro y entre piaras infectadas por *Haemophilus parasuis*. Como en el caso de las muestras de cornetes nasales positivas a *Haemophilus parasuis* que provenían de una sola piara, en donde se encontraron perfiles de ADN diferentes dentro de la misma.

Basados en la aplicación de este método de diagnóstico solamente algunas cepas son las responsables de la mortalidad observada en piaras afectadas. Además, en un estudio realizado por Oliveira *et al.*, (2001) concluyeron que aunque la mayoría de las piaras son afectadas por cepas con el serotipo 4 en E.U., cada piara tiene una diferente cepa prevalente y puede ser determinada por ERIC-PCR.

En cambio la prueba de PCR con los oligonucleótidos *Hps-R* y *Hps-F* permite la detección de *Haemophilus parasuis* cuando el aislamiento es negativo, cuya ayuda determina la verdadera prevalencia de infecciones sistémicas en las piaras (Oliveira *et al.*, 2001). Esto fue de gran ayuda al no poder aislar la bacteria de la mayoría de las muestras, pero se identificaron como positivos a *Haemophilus parasuis* mediante esta técnica 8 muestras de cornetes nasales y 4 de LCR. Esta técnica a diferencia de la ERIC-PCR utiliza oligonucleótidos específicos de especie que generan fragmentos de 821 pares de bases y que representan las región que codifica para la subunidad 16s del ARN ribosomal y da resultado negativos con otras bacterias que se encuentren contaminando la muestra. Sin embargo el aislamiento es necesario para la posterior caracterización y comparación de los aislamientos por el método de PCR con oligonucleótidos consenso enterobacteriales repetitivos intergénicos.

La utilización de la PCR en el diagnóstico de *Haemophilus parasuis* tiene muchas ventajas, una de ellas es permite la detección de la bacteria cuando no se logra el aislamiento, además la ERIC-PCR puede utilizarse para realizar estudios epidemiológicos. Entre las desventajas de la técnica de PCR se pueden encontrar falsos negativos, cuando los iniciadores no son específicos o cuando la concentración de los componentes de la reacción no se ha estandarizado. También se pueden presentar falsos positivos, si los iniciadores son homólogos a las secuencias pero no al gen blanco (Casamiglia, 1999) o si los productos y soluciones están contaminadas con residuos de reacciones anteriores.

El desarrollo de perfiles de ADN de *Haemophilus parasuis* mediante el ERIC-PCR nos permite la detección de cepas prevalentes que causan mortalidad en las granjas. Esta técnica podría beneficiar a muchas granjas por medio de la selección de cepas, para ser usadas en vacunas autógenas y también permitiría la comparación de aislamientos recuperados de nuevos casos clínicos en donde ya se haya aplicado una vacuna. Otro uso de esta técnica sería el examinar el surgimiento potencial de infecciones de cerdos que son sustituidos en las pjaras. Sin embargo la interpretación debe hacerse junto con el médico veterinario basándose también en la historia clínica de la granja para un diagnóstico global y así llegar a tomar una decisión correcta. El antibiótico a emplear debe ser administrado lo más temprano posible con respecto a la infección buscando la prevención. Previo al uso de autobacterinas se debe tener presente la mayoría de las granjas tienen más de un serotipo causando la enfermedad (Rosales 2001), esto nos dice que no existe la seguridad de que la cepa aislada sea una de las responsables de la enfermedad, debido a esto el uso de la ERIC-PCR podría tener un gran valor en el control de la enfermedad para identificar las diferentes cepas en granjas de México, incluso para diferenciar las cepas prevalentes en las etapas de producción.

6. Conclusiones.

Las muestras de campo para el aislamiento de *Haemophilus parasuis* deben transportarse en las condiciones adecuadas para mantener viables las cepas.

Se logró establecer el diagnóstico de las enfermedad de Glässer mediante la PCR tanto con los Oligonucleótidos ERIC-1R y ERIC 2 como con los Hps-R y Hps-F.

La ERIC- PCR es una técnica diagnóstica que nos permite diferenciar patrones de huellas genómicas entre cepas de *Haemophilus parasuis* de un mismo tipo de muestra y en la misma granja.

La técnica ERIC-PCR no es específica para la detección y el estudio de *Haemophilus parasuis*, sin embargo, si es selectiva para la generación de especies sin ambigüedad y huellas genómicas de cepas-específicas.

La prueba de PCR con los oligonucleotidos Hps-R y Hps-F hace posible la detección de *Haemophilus parasuis* aún cuando no se obtiene el aislamiento.

7. REFERENCIAS.

- Amano H, Shibata M, Kajio N, Morozumi T. 1994. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4, and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. J. Vet. Med., Sci., 56:639-644.
- Badiola, J. (2000). Diferenciación de cepas de *Pasteurella multocida* mediante el estudio comparado de sus cinéticas bioquímicas. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Genética y Microbiología.
- Bruijin, F.J. 1992. Use of repetitive (extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2180-2185.
- Calsamiglia, M; C. Pijoan, G.Solano, V. Rapp-Gabrielson. 1999. Development of an oligonucleotide-specific capture plate hybridization assay for detection of *Haemophilus parasuis*. Journal Veterinary Diagnostic Invest. 11:140-145.
- Ciprián A., Mendoza S. 2001a. Complejo Respiratorio Porcino. Tercer Ciclo Nacional Enfermedades Respiratorias del Cerdo. UNAM Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación FES-Cuautitlán. pp 5-21
- Ciprián A., Mendoza S., Lara H. 2001b. Problemas respiratorios por *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasmas* de reciente introducción en la producción porcina. Tercer Ciclo Nacional Enfermedades Respiratorias del Cerdo. UNAM Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación FES-Cuautitlán. pp 85-101
- Chang, B. 2003. Identification and differentiation of *Haemophilus parasuis* seronontypeable strains using a species-specific PCR and the digestion of PCR products with Hind III endonuclease. Am. Association of Swine Vet. 299-301.
- Estrada, R. 1997. Causas de las enfermedades respiratorias. Revista Cerdos. 8:20-22
- Ferri E., Gutiérrez B., del Puente V., García del Blanco N., Navas J., Paniagua C., Monter J. 2000. Meningitis bacterianas del cerdo: Enfermedad de Glässer. Porci Septiembre N°59.
- Gilson E., Perrin D., Hofnung M. 1990. DNA polymerase I and protein complex bind specifically to *E.coli* palindromic unithigly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. Nucleic Acids. Res. 18: 3941-3952.
- Herrera M., Huerta A., Hernández R. 2003. Investigación Aplicada S.A. de C.V. Tehuacan, Puebla. <http://www.iasa.com.mx>
- Hu X. Totake K. 1997. Molecular typing of *Staphylococcus epidermidis* and other CNS with repetitive element sequence based PCR.

- Iglesias, S. y Trujano, M. 2000. Modelos de interacciones que ocurren en el complejo respiratorio porcino. Veterinaria México. No. 1 Vol. 31.
- Kilian, M. 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. J. Gen. Microbiol. 93: 962
- Kielstein, P; V.J. Rapp-Gabrielson. 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. Journal of Clinical Microbiology. 30:862-865.
- Lichtensteiger CA, Vimr ER. 1997. Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. FEMS Microbiol Lett., 152:2, 269-274.
- Luque, C. y Herráez, A. 2001. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Ed. Harcourt. Mad.Esp.188-191.}
- Mendez-Trigo y Trigo E. 1996. Viability of *Haemophilus parasuis* in tisúes, exudates and pure cultura swabs. Proc. 14 IPVS Cong. Bologna Italy. p 314.
- Mendoza, S. y Pijoan, C. 2001. El estudio del PCR y las enfermedades respiratorias. Tercer Ciclo Nacional Enfermedades Respiratorias del Cerdo. UNAM Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación FES-Cuautitlán. pp 85-101
- Mendoza S., Torremorel M., Pijoan C. 1999. Conference sustainable animal production healt and environment, futures change. Hissar India. p 153
- Moller, K, Andersen LV, Christensen G, Kilian M. 1993. Optimizatrion of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhause pigs. Vet. Microbiol., 36:261-271.
- Morikoshi T, Kobayashi K, Kamino T, Owaki S, Hayashi S, Hirano S. 1990. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan. Jpn. J. Vet. Sci., 52:3,667-669
- Morozumi, T. and J. Nicolet. 1986. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. Journal of Clinical Microbiology. 23:138-142.
- Nicolet, J., 1990. Overview of the virulence attributes of HAP- group bacteria. Can J. Vet. Res. 54: S12-S15.
- Nielsen, R., 1993. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serotypes. Acta Vet. Scand., 34:193-198.
- Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. J Vet Diagn Invets 2001. 13(6): 495-501

- Oliveira, S; and Pijoan, C. 2003. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Veterinary Microbiology. Review.
- Oliveira, S; Pijoan C., and Morrison, R. 2003. Evaluation of *Haemophilus parasuis* control in the nursery using vaccination and controlled exposure. Swine Health Prod. 12: 123-128.
- Pijoan, C., Morrison, R.B., Hilley, H.D., 1983. Dilution technique for isolation of *Haemophilus parasuis* septicemia in pigs. Ust. J. Vet. Res. 60:187.
- Quiles, H. 2001. Sistemas modernos de producción porcina. Cuarto Ciclo Nacional Enfermedades Respiratorias del Cerdo. UNAM Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación FES-Cuautitlán.
- Rafiee M, Blackall PJ. 2000. Establishment, validation and use of the KielsteinRapp-Gabrielson serotyping scheme form *Haemophilus parasuis*. Aust. Vet J., 78:3, 172-174.
- Rapp-Gabrielson VJ, Gabrielson DA. 1992. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am. J. Vet. Res., 53:659-664.
- Rapp-Gabrielson VJ, Kocur G, Clark J, Muir S, Whige R. 1996. Efficacy and duration of immunity of the *Haemophilus parasuis* fractions of Suvaxyn[®] Respifend[®] MH/HPS. Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc., 14:300.
- Rapp-Gabrielson VJ, Kocur GJ, Clark JT, Muir SK. 1997. *Haemophilus parasuis*: immunity in swine following vaccination. Vet. Med., 92:83-90.
- Rosales F. 2001. Enfermedad de Glässer en la porcicultura actual. Tercer Ciclo Nacional Enfermedades Respiratorias del Cerdo. UNAM Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación FES-Cuautitlán. pp 115-118
- Rubies X, Kielstein P, Costa LI, Riera P, Artigas C, Espuña E. 1999. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. Vet. Microbiol., 66:245-248.
- Ruiz, A; S. Oliveira, M. Torremorell, and C. Pijoan. 2001. Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. Journal of Clinical Microbiology. 39: 1757-1762
- Segales J. 1996. Enfermedad de Glässer: conceptos generales de la infección por *Haemophilus parasuis*. Med. Vet., 13:11, 595-605.
- Solano-Aguilar G, Pijoan C, Rapp-Gabrielson V, Collins J, Carvalho LF, Winkelman N. 1999. Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection. Am. J. Vet. Res., 60(1):81-87.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Stanley J., Linton D., Sutherland K., Jones C. Owen R. 1995. High-resolution genotyping of *Compylobacter coli* identifies clones of epidemiology and evolutionary significance. *J. Infect. Dis.* 172: 1130-1134.

Tielen, M. 1995. Las enfermedades respiratorias de los cerdos. Prevalencia y efectos económicos. *Pigs-Misset. Especial de Enfermedades Respiratorias. Solvay Animal Health, Septiembre*, 4-5.

Torres, M. 2004. Efectos del Rubulavirus porcino en la presentación de la pleuropneumonia porcina producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo I. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Trigo E, Méndez-Trigo AV, Simonson R. 1996. Antimicrobial susceptibility profiles of *Haemophilus parasuis*: a retrospective study from clinical cases submitted during 1994 and 1995 to a veterinary diagnostic laboratory. *Proc. Int. Congr. Pig. Vet. Soc.* 14: 313

Vahle, J.L., Haynes, J.S., Andrews, J.J., 1997. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriologic, and morphologic findings. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 476-480.

Versalovic, J; T. Koeuth, and J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research.* 19:6823-6831