



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**CARACTERIZACIÓN DE LA TOXINA DE Actinobacillus
pleuropneumoniae SEROTIPOS 1, 3, 5 y 7 EN
SOBRENADANTES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:

CAROLINA RODRÍGUEZ DOMÍNGUEZ

ASESORES: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira
Dr. Abel Ciprián Carrasco



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.

Agradecimientos

A Dios.

Gracias por el regalo de la vida, por la familia que me diste y por haber guiado cada uno de mis pasos, hasta convertir mi sueño en realidad.

A mis Padres.

Por sus sacrificios, sus desvelos, su apoyo, ya que este logro es sin lugar a dudas gracias a ellos, creo que no tengo palabras para mostrar mi infinita admiración y respeto, espero poderles retribuir todo su cariño y cuidados que han tenido conmigo en cada etapa de mi vida. Los quiero mucho. ¡Mil gracias!

A mi Esposo.

Marcos, gracias por tu comprensión, tu amor, tu paciencia, tu apoyo incondicional, por estar conmigo en las buenas y en las malas; pero sobre todo gracias por ayudarme a convertir mi sueño en realidad. Sabes que TE AMO.

A mis hermanos.

Naye, Fabis, Fello; los quiero mucho y han sido una parte muy importante en mi formación como persona, gracias por todos los momentos lindos (y por los no tan lindos), que hemos pasado y por todo su apoyo.

A mis sobrinas.

Aquetzalli y Amellalli, por darle una alegría más a mi vida. Las quiero.

A mis abuelos.

Miguel Domínguez (+), Guadalupe Montoya (+), Tomás Rodríguez (+) Por todos los cuidados que tuvieron conmigo y por ser parte importante de mi formación.

A mí abuelita Rosario Salgado. Por todo su cariño, su apoyo, sus cuidados.

A mis tíos.

Miguel, Ramón, Antonio, Rosa, Carmen, Elvia, Mica, Inés, Clemente, Federico, Tomas, Nancy, Lupe, Angélica, Bertha, Gina, Sandra. Gracias por todo su apoyo tanto económico como moral.

A Lizbeth, Betty, Angel.

Por el apoyo durante la carrera, pero sobre todo por esa bonita amistad que me brindaron y que espero perdure por siempre, saben que cuentan conmigo.

A mis amigos.

Sol, Juan, Polo, Jazmín, Valentina, Martha, Ceci, Pedro, Ricardo, Xochitl, Mashenka, Susan, Vero, Humberto, Chuy, Miriam, Cecilia, Alma, Angeles, Azucena, Elsa, Araceli. Gracias por el apoyo que me brindaron, y por todos los momentos agradables que pasamos.

A la generación 27.

Por todos los momentos buenos y malos que pasamos como compañeros, Especialmente Gracias a los alumnos del área clínica, que aunque no pueda mencionarlos a cada uno saben que los llevo en mi corazón.

A la Doctora Susy.

Gracias por haberme permitido entrar en su laboratorio, por su trato y sus enseñanzas; realmente la admiro muchos y quiero que sepa que todo lo que ha hecho por mi siempre lo tendré presente, sabe que puede contar conmigo para cualquier cosa.

A Jorge.

Bueno primero que nada debo agradecerte el que hayas aceptado que trabajara contigo, ya que gracias a ello me dejaste conocer la gran persona que eres, mil gracias por tu tiempo, tus enseñanzas, tu paciencia, tu confianza y por tu amistad brindada.

A Móni.

Por tu amistad incondicional y por ser una gran ayuda para la elaboración de esta tesis, Recuerda que tienes una amiga por siempre. Gracias.

Al Laboratorio de Virología.

Alma, Itzel, Ale, Ángeles, Moni, Karla, Nambo, Julieta, Maria Luisa, Aleyda, Sr. Ángel, Mónica, Claudia, gracias por todo el apoyo brindado y por todos los buenos ratos que pasamos, pero sobre todo gracias por su Amistad.

Al Sr. Gabino.

Gracias por tenerme confianza, por sus pláticas tan amenas, por sus consejos, por los ratos tan agradables que pasamos en el laboratorio, lo considero un gran amigo.

Al Prof. David.

Por su apoyo, sus enseñanzas, sus consejos. ¡Mil gracias!.

A Chayo.

Gracias por los ratos tan lindos, por sus consejos y por dejarme conocer la persona tan agradable que es.

A mis sinodales.

Por último pero no menos importante, quiero agradecer a mis sinodales, por tomarse el tiempo de revisar este trabajo, ya que con cada una de sus observaciones lograron hacer de este un mejor trabajo.

INDICE

	Págs.
Presentación	i
Lista de tablas	ii
Lista de figuras	iii
Abreviaturas	iv
1.0 GENERALIDADES	1
1.1 Importancia de las enfermedades respiratorias	1
1.1.1 Historia de la enfermedad	3
1.1.2 Sinonimias	3
1.1.3 Transmisión	4
1.2 Agente etiológico	4
1.2.1 Características morfológicas y bioquímicas	4
1.3 Factores de Virulencia	8
1.3.1 Cápsula	8
1.3.2 Lipopolisacárido	8
1.3.3 Fimbrias citoadherentes	9
1.3.4 Proteínas de membrana externa	10
1.3.5 Toxinas Apx	10
1.4 Distribución geográfica	13
1.5 Patogenía y Transmisión	15
1.5.1 Factores predisponentes	15
1.5.2 Signos clínicos	16
1.5.3 Hiperaguda	16
1.5.4 Aguda	17
1.5.5 Crónica	17
1.5.6 Lesiones	18
1.6 Diagnóstico de la enfermedad	20
1.6.1 Diagnóstico clínico	20
1.6.2 Ensayos post-mortem	20
1.6.3 Aislamiento	20
1.6.4 Serología	21
1.6.5 Aglutinación y coaglutinación	21
1.6.6 Aglutinación en látex	22
1.6.7 Fijación del complemento	22
1.6.8 Elisa	23
1.6.9 Inmunofluorescencia indirecta	23
1.6.10 Precipitación en gel o inmunodifusión	24
1.6.11 Hemaglutinación indirecta	24
1.7 Tratamiento y prevención	25
1.7.1 Vacunación	26
1.8 Control de la enfermedad	27
2.0 JUSTIFICACIÓN	28
3.0 HIPÓTESIS	29
4.0 OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo General	30
4.2 Objetivos particulares	30
5.0 MATERIAL Y MÉTODOS	31
5.1 Lista de Reactivos	31
5.2 Material biológico	31

5.3 Equipos	31
5.4 Cepa bacteriana	32
5.4.1 Obtención de la semilla	32
5.4.2 Obtención de sobrenadantes ricos en toxinas Apx	32
5.5 Inactivación con formaldehído	32
5.6 Filtración	32
5.7 Concentración por liofilización	33
5.8 Determinación de proteínas por el método de Bradford	33
5.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida	34
5.9.1 Preparación del gel de poliacrilamida	34
5.9.2 Preparación de las muestras para electroforésis	35
5.9.3 Corrimiento electroforético	35
5.9.4 Tinción de proteínas en el gel de poliacrilamida-SDS	35
5.9.5 Tinción con nitrato de plata	35
6.0 RESULTADOS	37
6.1 Determinación de Proteínas por el método de Bradford	37
6.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida	38
7.0 DISCUSIÓN	40
8.0 CONCLUSIONES	43
9.0 REFERENCIAS	44
Anexos	48

Lista de tablas

Tabla No. 1. Enfermedades del sistema respiratorio de los porcinos.

Tabla No.2. Bacterias involucradas en el Complejo Respiratorio.

Tabla No.3. Primeros investigadores que estudian al *Haemophilus pleuropneumoniae* a nivel mundial.

Tabla No.4. Características bioquímicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Tabla No.5. Determinaciones principales y Diferenciación metabólica entre *Actinobacillus pleuropneumoniae* y especies próximas

Tabla No.6. Toxinas y grado de virulencia que presentan.

Tabla No.7. Variedades de App y toxinas que presenta.

Tabla No.8. Designaciones usadas para varias toxinas Rtx encontradas.

Tabla No. 9 Factores de virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Tabla No.10. Distribución mundial de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Tabla No.11. Distribución regional de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Tabla No.12. Vacunas Simples.

Tabla No. 13. Vacunas mixtas.

Tabla No. 14. Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de Bradford.

Tabla No. 15. Preparación de geles de poliacrilamida-SDS.

Tabla No.16. Concentración de toxinas Apx.

Lista de figuras

- Fig. No.1. Esquema de bacteria gram negativa.
- Fig. No. 2. Efectos del satelitismo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en diferentes condiciones.
- Fig. No .3. Cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en medios sólidos
- Fig. No.4. Esquema de la composición de LPS.
- Fig. No. 5. Animal infectado por App. en fase Hiperaguda.
- Fig. No. 6. Lesiones ocasionadas por App. en cerdos con fase aguda
- Fig. No. 7. Fotografías de lesiones en fase crónica.
- Fig. No. 8. lesiones microscópicas ocasionadas por App.
- Fig. No. 9. Fotografía de una prueba de aglutinación.
- Fig. No. 10. prueba de fijación al complemento.
- Fig. No. 11. fotografía que muestra una prueba de ELISA.
- Fig. No. 12. Hemaglutinación directa.
- Fig. No. 13. Sistemas de la curva de calibración.
- Fig. No. 14 Gráfico correspondiente a la curva de calibración.
- Fig. No. 15. Gel con tinción azul de Coomasie.
- Fig. No. 16. Tinción con nitrato de plata.
- Fig. No. 17. Filtración Tangencial

Abreviaturas

- App: Actinobacillus pleuropneumoniae
- Apx : Operones
- BHI : Infusión Cerebro Corazón
- CAMP: Fenómeno de Christie, Alkins y Much-Petersen
- DNA : Acido Desoxirribonucleico
- ELISA : Enzyme-liked Immunosorbent Assay
- I.M. : Intramuscular
- KDa : KiloDaltons
- LOS: Lipooligosacáridos
- LPS: Lipopolisacáridos
- NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido
- PCP: Pleuroneumonia Contagiosa Porcina
- PMN : Polimorfonucleares
- RTX : Repeat of Toxin
- SDS : Dodecilsulfato de sodio
- UFC : Unidades formadoras de Colonias

Presentación

Dentro de las enfermedades que afectan al tracto respiratorio del cerdo se encuentra la pleuroneumonía contagiosa porcina, siendo una de las enfermedades bacterianas más importantes. Es una enfermedad de elevada diseminación, altamente contagiosa y en muchas ocasiones letal en cerdos desde el destete al sacrificio.

Esta enfermedad es producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y los signos que presenta varían de acuerdo a la edad del animal, estado inmunológico, condiciones ambientales y grado de exposición al agente infeccioso; siendo una de las lesiones características la neumonía necrótico-hemorrágica con pleuritis fibrinosa.

Dentro de los factores de patogenicidad que presenta dicha bacteria tenemos las toxinas Apx, de las cuales presenta tres: Apx I (con carácter hemolítico y citotóxico), Apx II (con carácter hemolítico y levemente citotóxico) y Apx III (con carácter altamente citotóxico y no hemolítico).

Por ello es importante el estudio de dichas toxinas, por lo que en el presente trabajo nos encargamos de obtenerlas en sobrenadantes de cultivos de App serotipos 1, 3, 5 y 7, utilizando electroforesis para la identificación de las toxinas.

Esto puede ser utilizado para crear vacunas, pues las exotoxinas Apx pueden funcionar como antígenos protectores contra la infección de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

La enfermedad esta ampliamente distribuida en el mundo por ello es de vital importancia su estudio, ya que con ello se pueden pensar en medidas de prevención, control y tratamiento a esta enfermedad.

1.0 GENERALIDADES.

En la actualidad, la insuficiencia de alimento a nivel mundial ha obligado a los productores de cerdos a incrementar su producción, para cubrir las demandas. Los alimentos de industria porcina se pueden encontrar en cualquier región; nutrición, instalaciones, manejo, genética y diagnóstico, pero el área de la sanidad (enfermedades), continua siendo una gran limitante para la producción porcina. (11,36).

1.1 Importancia de Enfermedades Respiratorias.

En un estudio realizado en México (1999), se demostró que el 53.5% de las enfermedades de los porcinos corresponde a afecciones del sistema respiratorio (25,26, 34). Las lesiones que se reportan para el aparato respiratorio son diversas (Tabla No.1.). De las cuales destacan 82.6% asociadas a bacterias, seguidas por 16% a virus y 1.4% de origen parasitario (34).

Tabla No.1. Enfermedades del sistema respiratorio de los porcinos. (25,34).

Diagnóstico	Porcentaje
Rinitis atrófica	3.7
Bronconeumonía linfoproliferativa sugestivo de <i>Mycoplasma spp</i> y bacterias secundarias	23.5
Bronconeumonía purulenta por <i>Pasteurella multocida</i>	11.2
Bronconeumonía purulenta	20.4
Pleuroneumonía fibrino-necrótica por <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	11.9
Neumonía supurativa por <i>Actinomyces pyogenes</i>	2.0
Neumonía supurativa por <i>Streptococcus</i> α hemolítico	1.7
Neumonía fibrinopurulenta	6.8
Neumonía granulomatosa (negativo a BAAR)	1.4
Neumonía intersticial sugestiva de una infección viral	15.9
Neumonía por <i>Metastrongylus</i>	1.4

Dentro de los organismos patógenos que se asocian al complejo respiratorio porcino se encuentran bacteria, micoplasma y virus; los cuales se clasifican de acuerdo a su virulencia y patogenicidad en primarios (*Mycoplasma* y *Actinobacillus*) y secundarios (*Pasteurella*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, por mencionar algunos). (25, 26). Esto se puede observar en la Tabla No.2.

Tabla No.2. Bacterias involucradas en el Complejo Respiratorio. (25,34)

Patógenos Primarios	Patógenos Secundarios
<p style="text-align: center;"><u><i>Mycoplasma hyopneumoniae</i></u> <u><i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i></u></p>	<p style="text-align: center;"><u><i>Pasteurella multocida</i></u> <u><i>Bordetella Bronchiseptica</i></u> <u><i>Haemophilus paraseis</i></u> <u><i>Streptococcus suis</i></u> <u><i>Mycoplasma hyorhinis</i></u> <u><i>Actinomyces pyogenes</i></u></p>

De las neumonías ocasionadas por los patógenos antes mencionados la que es considerada como la más nociva es pleuroneumonía contagiosa porcina ocasionada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la cual tiene las siguientes repercusiones:

- 1.- Presenta una mortalidad elevada de animales en las etapas de crecimiento y engorda, donde se ha hecho una elevada inversión.
- 2.- Los animales que sobreviven a la enfermedad quedan como portadores sanos infectando a animales susceptibles, además, estos animales tienen retraso en su crecimiento y engorda por esto hay una inversión más alta para la salida al mercado.
- 3.- Este retraso de los animales sobrevivientes a la enfermedad provoca una alta densidad de animales en los corrales de finalización provocando la transmisión del microorganismo.
- 4.- Los gastos por concepto de tratamiento, bacterinas y diagnóstico se incrementan.
- 5.- La mano de obra se ve disminuida en otras áreas por brindar más atención a los animales enfermos. (36).

La pleuroneumonía contagiosa porcina es una de las enfermedades bacterianas más importantes de cuantas afectan al tracto respiratorio del ganado porcino (31), es devastadora, altamente contagiosa, debido a la cronicidad con que generalmente se manifiestan y se asocia en particular con cerdos en crecimiento, posee un extraordinario interés económico (13). Esto se traduce según los casos, por los altos porcentajes de mortalidad, y más importante aún, por las mermas en las producciones, alargamientos en el período de cebo, altos costos en medicamentos, asistencia veterinaria, etc. (24,37).

1.1.1 Historia de la Enfermedad.

La pleuroneumonía porcina fue observada por primera vez en Estados Unidos por Pattison en 1957 (3,31) y posteriormente en los años 60's en Gran Bretaña, California y Argentina. Se conoció entonces al *Haemophilus pleuropneumoniae*. Los primeros estudios realizados en el mundo para conocer las características e implicaciones de la enfermedad son los siguientes:

Tabla No.3. Primeros investigadores que estudian al *Haemophilus pleuropneumoniae* a nivel mundial. (27, 30).

Investigador	País	Año
Olander	Estados Unidos	1963
Shope	Argentina	1964
Nicolet y Koning	Suiza	1966
Nielsen	Dinamarca	1970
Shiefer y cols.	Canada	1974
Mylrea y cols.	Austria	1974
Kiopel	Alemania	1975
Hsu	Taiwán	1976
Pijoan	México	1978

En 1957 Pattison y cols. (27). Aislaron a partir de lesiones de cerdo con pleuroneumonía bacterias exigentes en NAD (Nicotinamida-Adenina-Nucleótido) (22,33). Estas bacterias se nombraron como *Haemophilus-like* antes de recibir la denominación bacteriana oficial bajo el nombre de *Haemophilus pleurpneumoniae*. (27). Aunque se ha demostrado mediante el análisis de estos datos (Tabla No.3.) que esta bacteria existió años antes de su aislamiento y caracterización. Al parecer la industrialización de la producción porcina permitió la difusión del microorganismo y de la enfermedad.

En 1983 phol. (27). hizo una reclasificación del agente etiológico dentro de el género *Actinobacillus*, basándose en estudios de genética bacteriana (estudios de hibridación de DNA). (4,27). Los primeros reportes que se tienen de la enfermedad en México, son la descripción clínica del problema, los aislamientos y estudios exhaustivos del mismo realizados en 1978 por Pijoan y cols. (27); en brotes originados en Tlaxcala, Penjámó y la Piedad, de entonces a la fecha, podemos decir que no existe cuenca porcina del país en donde no se haya registrado la enfermedad. (27,30)

1.1.2 Sinonimias.

La pleuroneumonía contagiosa porcina, tiene varias sinonimías como son: Pleuroneumonía contagiosa del cerdo, Actinobacilosis porcina, Pleuroneumonía enzoótica del cerdo. (7).

1.1.3 Transmisión.

La principal ruta de diseminación de la enfermedad es por vía aérea a través de aerosoles aunque solo en distancias cortas (31); también se transmite por contacto directo de un animal portador (con infección crónica), a otro animal susceptible.

Otra forma de transmisión es por exudado nasal impregnado en ropa o calzado (23,36). Pájaros, roedores y personas no son buenos vectores para la transmisión. Tampoco se ha podido demostrar por inseminación artificial o por transferencia de embriones (31).

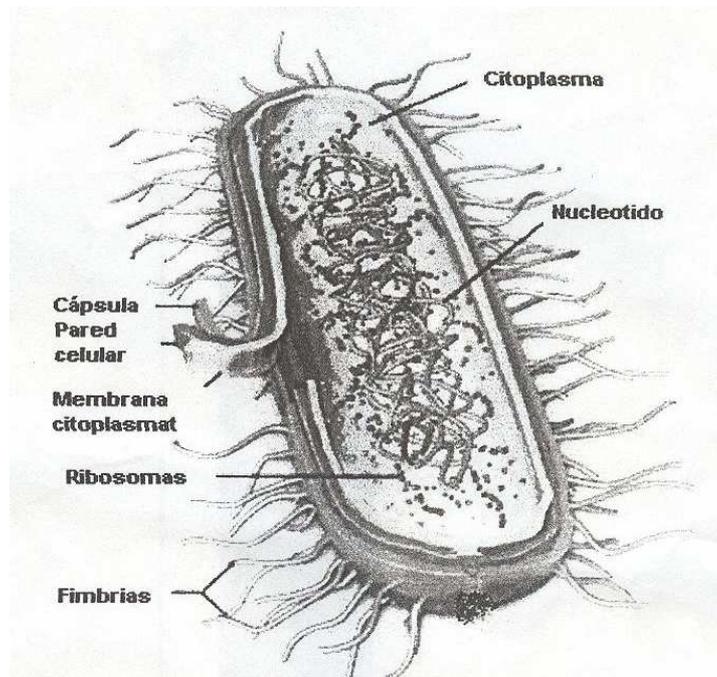
1.2 Agente Etiológico.

El agente etiológico de la Pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP) es el *Actinobacillus pleuropneumoniae* (33). Es un grave proceso específico del cerdo caracterizado por un tipo de neumonía hemorrágica y necrótica, acompañada de pleuritis fibrinosa, una de las más importantes enfermedades bacterianas de esta especie (38).

1.2.1 Características morfológicas y bioquímicas.

La bacteria es un bacilo pleomórfico gram negativo y encapsulado; esta integrado en el género *Actinobacillus* de la familia *Pasteurellaceae* (3,14), mide de 0.5 - 1.5 μm de largo por 0.3-0.4 μm de ancho (7,24). Es una bacteria que carece de flagelos (inmóvil) y no produce esporas sin embargo posee fimbrias citoadherentes. Estas características se pueden observar en la Fig. No.1.

Fig. No.1. Esquema de bacteria gram negativa.(11).



Para su identificación se realizan, como para cualquier bacteria, pruebas bioquímicas tanto primarias (motilidad, catalasa, oxidasa. etc.) como secundarias (Indol, citratos, ureasa, etc.)(20). Las principales actividades bioquímicas se pueden observar en la Tabla No.4.

Tabla No.4. Características bioquímicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (8, 20, 24, 31, 33).

Satelitismo con cepa nodriza.....	Positivo
Dependencia a NAD.....	Positivo
Dependencia a Hemina.....	Negativo
Fenómeno de CAMP.....	Positivo
Hemólisis.....	Positivo
Catalasa.....	Dudoso
Oxidasa.....	Dudoso
Ureasa*.....	Positivo
Nitratos*.....	Positivo
Indol.....	Negativo
Citratos.....	Positivo
Ácidos a partir de carbohidratos*.	
D(+)-glucosa.....	Positivo
D(+)-manosa.....	Positivo
D(+)-manitol.....	Positivo
D(-)-fructosa.....	Positivo
Inositol.....	Negativo
Fosfatasa alcalina.....	Positivo

Existen 2 biovariedades de *Actinobacillus pleuropneumoniae* los cuales se clasifican de acuerdo a su requerimiento de NAD, para su crecimiento siendo el biotipo 1 dependiente de NAD (virulenta) y el biotipo 2 independiente de NAD (menos virulenta).(28).

El NAD es también conocido como factor V (termolábil) ; este factor se lo proporcionan *in situ*, otros microorganismos denominados cepas nodrizas; entre estos microorganismos están : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus albus*, *Streptococcus faecalis*, especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, colocando una estría sobre el cultivo sospechoso de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, dicho fenómeno se conoce como satelitismo, (24,31). El cual se muestra en la Fig. No. 2.

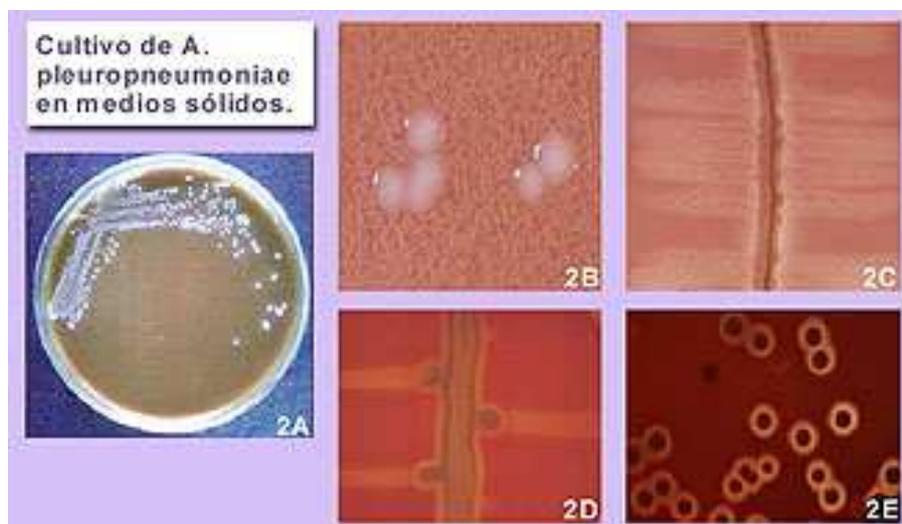
Fig. No. 2. Efectos del satelitismo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en diferentes condiciones. (31,41).



El empleo de *Staphylococcus aureus* nos permite observar además de la dependencia, el fenómeno de CAMP (Christie; Atkins y Munich- Petersen), en donde la beta hemolisina de la Toxina -B del estafilococos, actúa en forma sinérgica con la cohemolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, sobre las placas de agar sangre. (24). *Actinobacillus pleuropneumoniae* crece bien a 37°C preferentemente en presencia de CO₂ al 5%, al menos en los cultivos iniciales.(31).

Las colonias en agar BHI con la cepa nodriza, suelen ser muy pequeñas (menores a 1 mm), blanquecinas, brillantes y mucoides; las colonias en agar BHI suplementado con extracto de levadura o NAD se observan de mayor tamaño se conocen 2 variantes coloniales una lisa y otra rugosa y a veces adherentes al medio sólido. (24). El crecimiento de la bacteria en medios sólidos se ilustran en la Fig. No. 3.

Fig. No. 3. Cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en medios sólidos. 2 A: colonias en agar chocolate. 2B: colonias en agar PPLO enriquecido con NAD; 2C: satelitismo en agar sangre. 2D. Efecto CAMP; 2E: colonias hemolíticas en la presencia sangre.



En la siguiente tabla (Tabla No.5.) se muestran las diferencias metabólicas que existen entre *Actinobacillus pleuropneumoniae* y otras especies del mismo género. (20,31).

Tabla No.5. Determinaciones principales y Diferenciación metabólica entre *Actinobacillus pleuropneumoniae* y especies próximas. (20,31).

Tabla No.5. Determinaciones principales y diferenciación metabólica entre <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y especies próximas. (20,31).								
Carácter/ actividad	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. suis</i>	<i>A. indolicus</i>	<i>A. porcinus</i>	<i>A. minor</i>	Taxón C	<i>H. parasuis</i>	<i>P. multocida</i>
Acido de glucosa	+							
Acido de manitol	+	-			-		-	(+)
Acido de xilosa	+	+					-	V
Acido de ribosa	+						+	
Acido de lactosa	d	+			+		-	(-)
Ureasa	+	+			-		-	-
β-galactosidasa	+							
Fosfatasa alcalina	+							
Nitratos	+	+					+	
SH ₂	+							
Hemólisis	+	+	-	-	-	-	-	-
CAMP	+	-	-	-	-	-	-	-
V-dependencia	+	-	+	+	+	+	+	-
X-dependencia	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	-		+	-	-		+	
Producción de indol	-		+	-	-		-	

Como se ha indicado, inicialmente, sobre la base de la dependencia o no del NAD para el crecimiento, se describieron 2 biotipos (I y II); en el biotipo I se integraron 12 serotipos (1 - 12) y en los serotipos 1 y 5 se señalaron subtipos (a y b). Dentro del biotipo II, también se incluyeron serotipos 1 y 2. Sin embargo como consecuencia de que, pese al carácter dependiente o no de NAD, se comparten antígenos entre ambos biotipos, recientemente se ha unificado el sistema en un solo biotipo con 15 serotipos,(15) con la particularidad de que en los serotipos 2, 4, 7 y 9 pueden aislarse cepas independientes, igual que los serotipos 13 y 14. En cualquier caso, ambos biotipos producen pleuroneumonía porcina, clínicamente indiferenciable.

1.3 Factores de virulencia.

Actinobacillus pleuropneumoniae produce o posee un número importante de factores de virulencia que participan en la patogénesis de la pleuroneumonía contagiosa porcina (23) aunque todavía existen lagunas importantes en su conocimiento. Se incluyen factores estructurales, como la cápsula, el LPS(lipopolisacárido), fimbrias y algunas proteínas de membrana externa, y otros factores solubles, algunos de los cuales se excretan al exterior después de su producción, incluyendo exotoxinas Apx., superóxido dismutasa y algunas proteasas.(38)

1.3.1 Cápsula.

Es la responsable de la especificidad del serotipo, y que como en otros organismos debido a su carga negativa le confiere a la bacteria protección en contra de la fagocitosis por las células del sistema inmune del hospedador. (16)

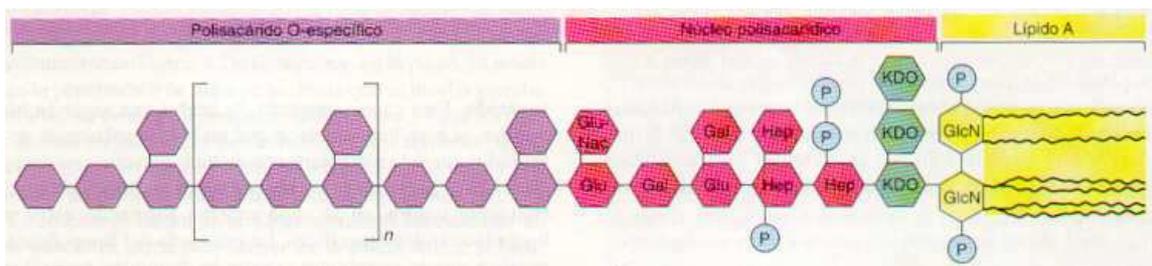
Dentro de las propiedades biológicas de la cápsula se mencionan las siguientes: Son inertes, no tienen actividad tóxica, no tienen actividad pirógena, sin embargo se han encontrado que matan al embrión de pollo, presentan actividad blastogénica linfocitaria debido a la carga negativa que le confiere la cápsula hay resistencia a la fagocitosis por neutrófilos PMN (Polimorfonucleares) es opsonizado por los anticuerpos e interfiere con la actividad del complemento hacia la membrana.

Los anticuerpos generados contra la cápsula, solo protegen contra la muerte, pero no contra las lesiones pulmonares y a la infección crónica. La virulencia atribuida a la cápsula es variable entre los diferentes serotipos, y aunque es requerida para que un *Actinobacillus pleuropneumoniae* sea virulento, aún no se conoce por completo el papel patogénico de la cápsula. (24)

1.3.2 Lipopolisacárido.

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar una membrana externa, que estructuralmente es idéntica a la membrana celular o interna, solo que en la membrana externa o envoltura celular se encuentra enclavado en lipopolisacárido (LPS); el cual está compuesto por un lípido A formado por ácidos grasos, glucosa, galactosa, ramnosa y los aminoazúcares n-acetilglucosamina y n-acetilgalactosamina. (24,30). Esta estructura es presentada en la Fig. No. 4.

Fig. No.4. Esquema de la composición de LPS. (17).



En *Actinobacillus pleuropneumoniae* se encuentra un antígeno somático denominado "O", situación que no ocurre con las bacterias del género *Haemophilus*, por lo que el término LPS no se aplica y si el de Lipooligosacárido (LOS). Los antígenos LOS son los responsables de cruces antígenicos entre dos diferentes serotipos: serotipo K:1, tiene O:1; serotipo K:2, tiene O:2 ; serotipo K:3, tiene O:3 ; serotipo K:4, tiene O:4 ; serotipo K:5^a, tiene O:5 ; serotipo K:5b, tiene O:5; serotipo K:6, tiene O:3 ; serotipo K:7, tiene O:4 ; serotipo K:8, tiene O:3; serotipo K:9, tiene O:1 ; serotipo K:10, tiene O:7; serotipo K:11, tiene O:1 y serotipo K:12, tiene O:8.(24)

Los LPS, de la pared celular son importantes en el desarrollo de una respuesta inmune después de la infección con App. (30). Se han diferenciado dos tipos I y II; el primero esta presente en los serotipos 1, 6, 9, 11 y el II en el resto (3, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14 y 15).

Se ha descrito cepas lisas para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (en los serotipos 2, 4 y 7); semirrugosas (serotipos 1 y 5) y rugosas (en los serotipos 3 y 6); condicionados a la presencia compleja, parcial o ausencia de las cadenas laterales O.

Las propiedades biológicas del LPS se resumen en las siguientes actividades:

- ❖ Tienen la actividad biológica clásica de una endotoxina de los Gram negativos.
- ❖ El LPS de *Actinobacillus pleuropneumoniae* melifica a los amebocitos del género *limulus*, cuando se inócula por vía intradérmica se produce una reacción de Schwartzman.
- ❖ Actúa como pirógeno.
- ❖ El LPS de los diferentes serotipos de App, induce infiltración de células inflamatorias cuando se inócula a ratones y cerdos por vía respiratoria, observándose una neumonía intersticial multifocal y no la neumonía fibrinohemorrágica necrótica clásica de la PCP.

1.3.3 Fimbrias citoadherentes.

En la FES-Cuautitlán , se han realizado una serie de trabajos que mostraron que cuando se inocularon por nebulización con *Actinobacillus pleuropneumoniae* (en una cama de aerosoles) a cerdos, conejos, ratones y cuyes, solo los cerdos se infectaron y murieron con inóculos que variaron de 2×10^4 hasta 2×10^8 unidades formadoras de colonias /ml (UFC/ml). Estas evidencias muestran la alta especificidad de especie de *Actinobacillus pleuropneumoniae* hacia el cerdo, sugiriendo probablemente, que el cerdo posee receptores específicos hacia el factor de adherencia de esta bacteria.(24)

En otros estudios se han identificado en *Actinobacillus pleuropneumoniae* estructuras semejantes a fimbrias o pilis citoadherentes, denominadas también adhesinas. Sin embargo no se han encontrado estos apéndices extracelulares en *Actinobacillus*

pleuropneumoniae cultivados *in vitro*, y al parecer solo la bacteria expresa estos antígenos en el cerdo.

Recientemente se han identificado estas estructuras mediante microscopía electrónica y estudios de patogenicidad en cerdo SPF, en donde se demuestra que *Actinobacillus pleuropneumoniae* tiene y presenta factores de adherencia o pilis citoadherentes en el cerdo, mientras que solo se mantienen estos pilis en los primeros pasos de la bacteria en medios de cultivo *in vitro*. (24). La fimbria hace posible la adhesión bacteria a tejidos, la adherencia a células hospederas en algunas veces considerada como un paso inicial en la patogénesis de la enfermedad.

1.3.4 Proteínas de membrana externa.

Existen sistemas de captación de hierro, entre los que se incluyen las proteínas de membrana externa captadoras de transferrina TfbA y TfbB, así como otros mecanismos que le permiten a la bacteria obtener hierro del medio a través de agentes sideróforos. (18). La proteína TfbA codificada por el gen *tfbA* posee un tamaño de entre 90 y 110 KDa (KiloDaltons); mientras que la proteína TfbB, que esta codificada por el gen *tfbB* tiene un peso molecular de entre 80 y 90 KDa. (29).

El perfil de las proteínas localizadas en la membrana externa se han estudiado en todos los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, basándose en la movilidad de estas proteínas, la migración ocurrió de la siguiente manera: en las regiones 34 - 44 KDa; de 16 - 16.5 KDa y en la región 29 KDa correspondiente a una proteína modificable por el calor, por lo que se han identificado 7 patrones en nueve serotipos probados.

Las proteínas de membrana externa en los serotipos 1 y 9 fueron idénticas (estos serotipos presentan reacción cruzada por sus antígenos capsulares); así como los serotipos 2 y 6 (estos serotipos no cruzan por sus antígenos capsulares), los serotipos 3, 4, 5, 7 y 8 presentaron perfiles proteínicos diferentes estos serotipos solo cruzan por sus antígenos capsulares de la siguiente manera : el 3 con 8; 4 con 7 y el 5 que no cruza con los demás.

1.3.5 Toxinas Apx.

En los sobrenadantes de los cultivos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Se ha encontrado actividad tóxica, sobre diferentes células tales como linfocitos y macrófagos alveolares, pero principalmente contra glóbulos rojos, esta actividad funcional han determinado que a estos factores tóxicos se le denomine con anterioridad como “hemolisinas” o “citolisinas”. Se han encontrado cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que son muy citotóxicas y hemolíticas; otras son poco citotóxicas y poco hemolíticas y otras que son solo citotóxicas. (6,16)

Hoy en día estas toxinas pertenecen a la familia de toxinas denominadas RTX (Repeat of Toxin) (1, 6, 9); se caracterizan por ser funcionalmente porinas (poseen repeticiones ricas en glicina) , producen poros en las membranas celulares principalmente de macrófagos y neutrófilos provocándoles la muerte (9,31). Dichas toxinas pertenecen a dos categorías: la hemolisina, que afectan una variedad de células y la citotoxina que afectan solo células específicas. (6,21)

Se han identificado tres tipos distintos de actividad en las citotoxinas: (1,2, 6, 24)

- Rtx 1 (citolisina 1): Hoy conocida como Apx I
- Rtx 2 (citolisina 2): Hoy conocida como Apx II
- Rtx 3 (citolisina 3): Hoy conocida como Apx III

La diversidad de estas toxinas también explica las diferencias de virulencia. Apx I es fuertemente hemolítica y fuertemente citotóxica, Apx II es débilmente hemolítica y moderadamente citotóxica y Apx III es no hemolítica pero fuertemente citotóxica. (2,19). La Tabla No.6. muestra las diferentes toxinas y el grado de virulencia que presentan

Tabla No.6. Toxinas y grado de virulencia que presentan. (28).

Toxina	Grado de Virulencia
Apx I	Muy virulenta
Apx II	No es tan virulenta
Apx III	Poco virulenta

Se ha encontrado que Apx I la producen los serotipos 1, 5, 9 y 11; así mismo Apx II la producen prácticamente todos los serotipos menos el 10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12) mientras que Apx III la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8. (22,24). Se observa en la tabla No.7. Las variedades de Apx y las toxinas que presenta Así como los antígenos.

Tabla No.7. Variedades de App y toxinas que presenta. (22)

Serovariedades	Antígeno "O"	Antígeno "K"	Apx I	Apx II	Apx III
1	01	K1	√	√	×
2	02	K2	×	√	√
3	03	K3	×	√	√
4	04	K4	×	√	√
5	05	K5	√	√	×
6	03	K6	×	√	√
7	04	K7	×	√	×
8	03	K8	×	√	√
9	01	K9	√	√	×
10	06	K10	√	×	×
11	01	K11	√	√	×
12	07	K12	×	√	×

Se ha descrito una prueba de neutralización de la hemolisina, usando sobrenadante de *Actinobacillus pleuropneumoniae* como fuente de hemolisina. Esta prueba ha mostrado varias ventajas sobre las pruebas convencionales como sería: no son serotipo-específicas, permiten diferenciar entre animales vacunados y no vacunados, tienen buena sensibilidad. Sin embargo tienen problemas de especificidad porque HL1 muestra reacciones cruzadas con una variedad de bacterias en las que se incluyen *Escherichia coli*, *Pasteurella haemolytica* y *Actinobacillus suis*. La Tabla No.8. muestra las designaciones para las toxinas RTX encontradas en *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Tabla No.8. Designaciones usadas para varias toxinas Rtx encontradas. (12).

Nueva designación		Sinonimos	
Nombre de la Toxina	Proteína/símbolos del gen	Nombre de la toxina	Proteína/símbolos del gen
Toxina RTX I	Apx I	Hemolisina I	Hly I
	apx IC		hly C
	apx IA		hly IA
	apx IB		hly IB
	apx ID		hly ID
Toxina RTX II	Apx II	Hemolisina II	Hly II
	apx IIC		hly IIC
	apx IIA		hly IIA
Toxina RTX III	Apx III	Pleurotoxina	Ptx
	apx IIIC		
	apx IIIA		ptx A
	apx IIIB		
	apx IIID		

La Tabla No.9 tenemos un resumen de los factores de virulencia presentes en *Actinobacillus pleuropneumoniae* así como su composición y la función que realizan, dentro de la bacteria.

Tabla No. 9 Factores de virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.(30).

Estructura celular	Función	Composición	Referencia
Fimbria	Adhesión	Proteínica	(55)
Cápsula	Evasión de Fagocitosis	Polisacárido	(24)
Hemolisinas	Lisis de células rojas	Proteínica	(6,8)
Citotoxinas	Toxicidad a células	Proteínica	(8,10)
Membrana externa	Choque endotóxico	Lipopolisacárido	(51)
Receptores	Captación de Hierro	Proteínica	(20)
Factor de permeabilidad	Desconocida	Desconocida	(30)
Proteasas	Degradación de sustratos	Proteínica	(28,36)

1.4 Distribución Geográfica.

La pleuroneumonía contagiosa porcina tiene una distribución mundial afectando a la mayoría de las poblaciones productoras de cerdos.

En Canadá se han estimado alrededor de 40 millones de dólares canadienses de pérdidas; mientras que en Estados Unidos las pérdidas se estiman entre 200 y 250 millones de dólares anuales. En México prácticamente no existe zona con porcicultura intensiva en donde no se allá reconocido la enfermedad, consecuentemente su significado económico es muy alto. (13).

Dentro de la Tabla No.10. podemos apreciar que serotipos se presentan en cada uno de los países afectados; así como cual es el serotipo que domina en dicho país. Dándonos así una idea de la distribución mundial que presenta la bacteria.

Tabla No.10. Distribución mundial de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (23, 24, 27)

País	Serotipos Prevalentes	Serotipos dominantes
Argentina	1,2,3,5,12	1
Australia	1,2,3,7,12	1
Bélgica	2,3,6,7,8,9,11	3
Brasil	1,3,4,5,7,9	5,3
Canadá	1,2,3,5,6,7,8,10	5,7,1,12
Chile	1,5	1,5
Croacia	2,7,8,9	2,9
Checoslovaquia	1,2,7	2
Dinamarca	1,2,3,5,6,7,8,10,11,12	2
Francia	2,3,7,8,9	9
Alemania	2,3,4,5,6,7,9,10	9,2,7
Hungría	1,2,3,5,6,7,9,10,11,12	3,2,7
Italia	1,2,3,4,5,7	5
Irlanda	3	3
Japón	1,2,3,5,6,7,8,9,12	1,2
Corea	2,3,5,7	5,2
México	1,2,3,4,5,6,7,8,9	1,8
Holanda	1,2,3,5,7,8,9,11	2,9,11
Polonia	1,2,5,9	1,9
España	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12	4,7,2
USA.	1,3,5,7,8,9	1,5
Venezuela	1,2,3,4,6,7	1

Como se observo en la tabla anterior México es uno de los países en los cuales se encuentra presente App., Por lo que en la Tabla No.11, podemos apreciar en que estados y que tipo de serotipos son los que se presentan. Siendo Querétaro el estado que más serotipos presenta, seguido por Puebla y teniendo a Jalisco y Michoacán como los que menos serotipos presenta.

Tabla No.11. Distribución regional de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (36)

Estado	Serotipo identificado
Jalisco	1,2,8,9
Michoacán	1,2,8,9
Guanajuato	1,2,3,4,7,10,11
Puebla	1,2,3,4,5,6,7,10,12
Edo. de México	1,2,3,4,7,10,12
Sonora	1,2,3,4,7,10,12
Querétaro	1,2,3,4,5,6,7,10,12
Yucatán	1,2,3,5,6,10,12

1.5 Patogenía y Transmisión.

La infección se produce por aerosol o por contacto directo entre animal enfermo y animal sano, el cerdo es la única especie que en forma natural es susceptible a *Actinobacillus pleuropneumoniae*. También los cerdos pueden infectarse en forma indirecta, por el mismo personal de la granja, por medio de la ropa, botas e instrumental contaminado. El papel de los roedores y de los pájaros en la diseminación de la pleuroneumonía contagiosa porcina ha sido descartada, debido a que no se ha logrado aislar de estos animales, sin embargo, trabajos realizados recientemente han revelado que los pájaros tienen anticuerpos contra los serotipos 1, 2 y 9 de App. (24)

En los estudios de infección experimental se ha podido demostrar que *Actinobacillus pleuropneumoniae* coloniza las tonsilas y el epitelio alveolar. En el pulmón el microorganismo es fagocitado rápidamente por los macrófagos alveolares, pero debido a la producción de las toxinas Apx I, Apx II y Apx III que tienen un marcado efecto tóxico para los macrófagos alveolares, la fagocitosis no actúa adecuadamente, las toxinas también afectan a las células endoteliales de los vasos capilares alveolares y sus efectos son los causantes de las lesiones típicas de la enfermedad. En infecciones experimentales se han observado lesiones pulmonares que comienzan a ser evidentes a las tres horas postinfección y continúan después, de forma progresiva. (31)

1.5.1 Factores predisponentes.

La persistencia de App en cerdos depende de un número de factores incluyendo el estado inmune de los cerdos. Por esto los factores causantes de una inmunosupresión son los factores más importantes para la presentación de la pleuroneumonía. (7) Se ha reportado una interacción entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y el App. La infección viral es un factor inmunosupresor que favorece la presentación del cuadro hiperagudo de la enfermedad (16). Otro factor que está relacionado con la inmunosupresión de los cerdos es el estrés, este parece íntimamente ligado con los brotes agudos de la pleuroneumonía. Por lo tanto los factores del estrés juegan un papel importante en la presentación de App. Entre estos tenemos: cambios bruscos de temperatura, manejos estresantes, transportes y épocas frías durante el año.

Otros factores son: Asociación con otros microorganismos que afectan aparato respiratorio, retención de animales seropositivos que juegan un papel importante en la diseminación del microorganismo, alta humedad, malas condiciones higiénicas tanto de instalaciones como de trabajadores, entrada de transportes sin previa desinfección; esto se resume en una mala bioseguridad. (24,30). La morbilidad se puede presentar hasta en un 100% con una mortalidad variable que va desde el 20 hasta el 80%. La mortalidad se presenta en cerdos de 4 semanas de edad, sin embargo, las pérdidas por muerte se encuentran limitadas en cerdos de 12 - 16 semanas de edad. (24)

1.5.2 Signos clínicos.

Los signos clínicos varían de acuerdo al estado inmune de los animales, estrés, condiciones ambientales diversas y el grado de exposición al agente infeccioso. (31,33) El período de incubación de la enfermedad es de horas a algunos días y puede evolucionar en tres formas clínicas: hiperaguda, aguda y crónica (22). Las dos primeras se dan en explotaciones indemnes, infectadas por primera vez, mientras que la crónica se relaciona con áreas endémicas. (31).

1.5.3 Hiperaguda.

Este cuadro se inicia con anorexia y apatía, fiebre de 41.5 – 42 °C, existe un período corto donde se presenta vómito, diarrea leve; posteriormente se presentan fallas circulatorias como cianosis en piel, abdomen y orejas. Postración respiración por hocico, adoptando la posición descrita como “perro sentado” que usualmente se acompaña de descargas sanguinolentas por fosas nasales y hocico. En la Fig.No. 5. podemos observar a un cerdo en fase hiperaguda de la enfermedad.(41).

Fig. No. 5. Animal infectado por App. en fase Hiperaguda. (41).



En neonatos se presenta una meningitis con signos nerviosos, asociados a un cuadro respiratorio, en reproductoras se han descrito de forma ocasional abortos. La muerte ocurre de las 24 – 36 horas, aunque ocasionalmente algunos animales mueren súbitamente. Esto causa una mortalidad del 80 – 100 % y una morbilidad del 80% (23, 24, 31,40)

1.5.4 Aguda.

Tiene una evolución menos rápida y puede desarrollarse a una forma crónica. Inicia con fiebre de 40 – 41°C, tos húmeda (intermitente y dolorosa), disnea, resistencia a moverse, anorexia, depresión, extensión y rigidez de cuello y cabeza dirigiéndolas hacia el frente, hocico semiabierto (respiración por hocico), letargia, dificultades respiratorias evidentes, pueden ocurrir fallas circulatorias, como son cianosis en orejas y extremidades, vómito ocasional. Este cuadro puede ocasionar la muerte o la recuperación; la muerte se caracteriza por presentar hemorragia nasal, esta puede ocurrir de 1 a 4 días, o bien se da la recuperación espontánea. Esta forma provoca una mortalidad del 10 – 30 % y una morbilidad del 80 %. (23, 31, 34,40).

Entre las lesiones que se presentan en la fase aguda se produce una congestión capilar de la pared alveolar con edema marcándose el septo intersticial. La acumulación de neutrófilos agrava el daño de la pared alveolar provocando una trombosis arterial con necrosis tisular. Esto se puede observar en la Fig. No. 6.

Fig. No. 6. Lesiones ocasionadas por App. en cerdos con fase aguda.(41).



1.5.5 Crónica.

Esta fase es difícil de caracterizar. Aparece después de un cuadro agudo o al mismo tiempo. No presenta fiebre se observa tos variable e intermitente, pérdida de apetito y baja en la ganancia de peso diario. (13, 31, 40). Los síntomas clínicos puede exacerbarse por otras infecciones respiratorias, (bacterias virus, micoplasma). El serotipo 3 de App puede causar artritis, endocarditis y oclusión en diferentes localizaciones en animales individuales últimamente se ha relacionado la enfermedad del oído medio con infecciones de App. (23,31).

En esta fase se observa que la pleura se engrosa y con abundante fibrina, la consistencia del pulmón es dura y friable, como se observa en la Fig. No. 7., donde también podemos observar una comparación entre un pulmón sano y uno con pleuroneumonía, en fase crónica.

Fig. No. 7. Fotografías de lesiones en fase crónica. (41).



Los animales con la forma crónica de la enfermedad quedan como portadores sanos; otras enfermedades respiratorias o factores de estrés pueden desencadenar o incrementar los síntomas de la pleuroneumonía crónica. (7,23). También se pueden observar abortos principalmente en el último tercio de la gestación. (10).

1.5.6 Lesiones.

Las lesiones macroscópicas se localizan principalmente en el tracto respiratorio; se caracterizan principalmente por una pleuroneumonía fibrinohemorrágica con necrosis coagulativa. También ha sido reportada la presencia de fluido serosanguinolento en cavidad pericárdica. (23).

Las lesiones más obvias ocurren en cavidad torácica y consisten en neumonía y pleuritis, usualmente las lesiones neumónicas son en el lóbulo caudal pero pueden ocurrir en el lóbulo craneal y mediano. El septo interlobular se encuentra edematoso y engrosado, en algunos casos se pueden observar amplias bandas de hemorragias cercanas a áreas de necrosis debajo de la pleura y el septo intralobular. (31).

Se encuentran agrandados los nodos linfáticos bronquiales y mediastínicos. Las lesiones también pueden ser descritas en otros órganos más: pericarditis con adherencias al pericardio, infartos renales, aumento en la cantidad de fluido peritoneal conteniendo bandas fibrinosas. (23) Las lesiones que se presentan dependen de la fase de la infección:

Fase hiperaguda: se encuentra que tanto la traquea como los bronquios están llenos de exudado mucoso, espumoso y teñido de sangre; las áreas neumónicas aparecen oscuras y sólidas con poca o ninguna pleuritis fibrinosa.

Fase aguda: la pleuritis es muy obvia y la cavidad torácica contiene líquido sanguinolento. Con el paso del tiempo las lesiones avanzan, por lo que la pleuritis fibrinosa, se vuelve fibrosa y puede adherirse tan fuerte a la pleura parietal que el parénquima pulmonar, puede permanecer fijado a esta, cuando se extraen los pulmones en el examen post-mortem.

Existen lesiones pulmonares de color rojo oscuro se vuelven de un color brillante y permanecen firmes solo en las áreas más afectadas. Las lesiones se retraen y disminuyen de tamaño a medida que la resolución progresa hasta que en los casos crónicos permanecen nódulos de diferentes tamaños, la mayoría de ellos localizados en el lóbulo diafragmático. Estos nódulos pueden asociarse con áreas de pleuritis fibrosa adherente.

Fase crónica: las lesiones se caracterizan por consolidación de tejido pulmonar, zonas infartadas encapsuladas y tejido de cicatrización, con secuestros necróticos, rodeados por fibrosis en los septos interlobulares adyacentes. (23,31).

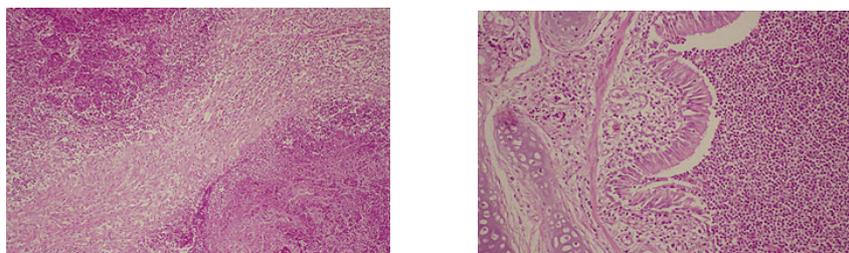
Microscópicamente se observa en las áreas pulmonares afectadas por la forma hiperaguda; congestión, trombosis, hemorragia y edema. Existe exudación de fibrina hacia los septos interalveolares y alveolos, en los que podemos observar neumocitos descamados y células inflamatorias. (24,31). Los septos interlobulares aparecen engrosados a causa del edema intersticial, con los vasos linfáticos dilatados, además de la presencia de células inflamatorias y eritrocitos entre las redes de fibrina.(23,31)

Dentro de la forma aguda encontramos que las áreas neumónicas presentan focos de necrosis por coagulación, rodeadas de células inflamatorias, de igual forma se observa fibrina, glóbulos rojos y neumocitos en la luz de los alveolos. (10). Los septos alveolares se encuentran engrosados y es frecuente la trombosis vascular.

Si el proceso evoluciona hacia la cronicidad tiene lugar la proliferación de tejido de granulación alrededor de las zonas de necrosis, que resultan posteriormente limitadas por la capsula de tejido conectivo. (31). Estas lesiones pueden albergar microorganismos que duran varios meses y generan la fase de portadores transmitiendo la enfermedad a otros portadores susceptibles.

Una de las complicaciones más frecuentes de la pleuroneumonía porcina es la pericarditis serofibrinosa con desarrollo posterior de adherencias y engrosamiento fibroso (Fig. No. 8.). Aunque en la mayoría de los casos las lesiones están limitadas a la cavidad torácica, a veces se puede observar también peritonitis fibrinosa, meningoencefalitis purulenta, endocarditis ulcerosa, artritis y osteomielitis.

Fig. No. 8. Lesiones microscópicas ocasionadas por App.(41)



1.6 Diagnóstico.

El diagnóstico definitivo de PCP debe ser oportuno y rápido y es esencial identificar los diferentes serotipos prevalentes en el país, para así elaborar los biológicos adecuados para el diagnóstico y la inmunización de los animales. En el Diagnóstico de PCP se emplean diversos métodos, sin embargo solo uno o dos de ellos confirman la enfermedad y el serotipo presente: (24,39)

- a) Signos y curso de la enfermedad en el cerdo y en la pira.
 - b) Ensayos post-mortem
 - c) Aislamiento de App del tracto respiratorio
 - d) Serología
- (30)

1.6.1 Diagnóstico clínico.

Se basa en la observación de los signos clínicos en el cerdo y en los de zahúrda; este método no es confiable ya que solo los signos clínicos se presentan en los cursos agudos de la enfermedad, mientras que los casos crónicos pasan inadvertidos. (24).

El cuadro hiperagudo conocido como neumonía hemorrágica; se caracteriza por lo espectacular de la enfermedad, los signos son rápidos, la afección respiratoria es tan severa que los cerdos respiran con el hocico abierto, hay hemorragias y espuma en la nariz y la boca antes de morir. (24).

1.6.2 Ensayos post-mortem

Se lleva a cabo a partir de la observación de las lesiones, después de practicar la necropsia, o durante la inspección en los centros de abasto de los casos crónicos. Para en estudio patológico se requiere de los servicios de un médico veterinario especialista.

En piaras contagiadas la examinación post-mortem es importante y podría en muchos casos, permitir un correcto diagnóstico. (30).

1.6.3 Aislamiento.

Se realiza a partir de la toma de muestra de los pulmones de cerdos con problemas agudos o bien crónicos, esto tarda de 48 – 72 horas; se realiza en un laboratorio de bacteriología con un personal calificado. (24). Las muestras que se utilizan son trozos de lóbulos diafragmáticos (principalmente) o de otros lóbulos que presentan lesiones típicas de PCP. (37). si se requieren enviar al laboratorio deben ser congeladas o con bastante hielo, ya que las cepas de App se conservan en el pulmón infectado a -70°C .

Se siembran las partes afectadas de las muestras en BHI o PPLO agar con 5% de sangre de bovino u ovino. Para el aislamiento primario es importante que el NAD se lo proporcione in situ otro microorganismo mediante una estría sobre el cultivo sospechoso de App. El empleo de *Staphylococcus aureus* nos permite observar además de la dependencia el fenómeno de CAMP. También se realizan las pruebas bioquímicas tanto primarias como secundarias para su identificación.(20, 41).

Para realizar la tipificación de App se utilizan antisueros específicos contra los 12 serotipos capsulares. Los métodos más utilizados son; pruebas de aglutinación, de precipitación, las de fluorescencia; sin embargo la prueba de coagulación practicada de sobrenadantes de muestras a pulmón con lesiones que fueron tratadas con calor ahorra el aislamiento primario, los pasos de purificación y la identificación bioquímica.(24).

1.6.4 Serología.

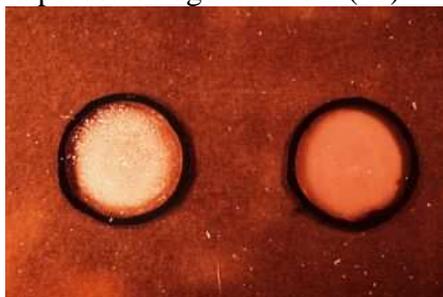
El diagnóstico serológico se lleva a cabo en los cerdos vivos en granjas; es el método más adecuado ya que se realiza en animales vivos con o sin signos clínicos, no requiere del sacrificio de cerdos y es más rápido, además de que permite hacer perfiles de la enfermedad, identificando el punto de infección de la granja.

Para el diagnóstico serológico encontramos entre otras pruebas las siguientes: aglutinación y coagulación, aglutinación en látex, fijación del complemento, Elisa, 2-mercaptoetanol, hemoaglutinación indirecta, precipitación en gel o inmunodifusión, neumotest. (11,41).

1.6.5 Aglutinación y Coagulación

Son métodos simples rápidos o lentos, para la identificación y serotipado de las cepas de App. Existen 3 variantes útiles para la aglutinación: la reacción lenta en tubo, la aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol y la aglutinación rápida en portaobjetos. (24). Los antisueros utilizados son producidos mediante la inmunización de conejos con cada una de los serotipos (siguiendo protocolos convencionales). Con el antisuero obtenido se practican diluciones seriadas, que se mezclan con el antígeno a partes iguales. El resultado de la aglutinación se determina por inspección visual a diferencia de otro sistema. En la Fig. No. 9. observamos una prueba con un suero positivo y uno negativo.

Fig. No. 9. Fotografía de una prueba de aglutinación. (41).



1.6.6 Aglutinación en látex.

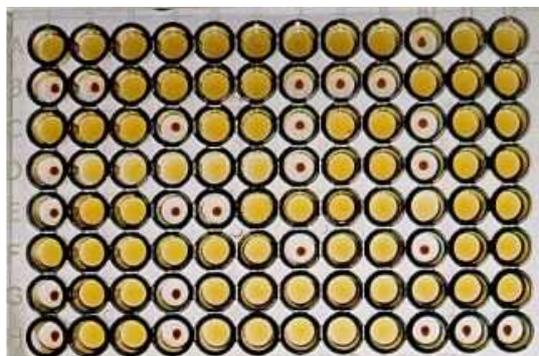
Fue descrita inicialmente para la diferenciación de los serotipos 1, 2, 3, 5 y 9. Inicialmente generaba múltiples reacciones cruzadas; pero al realizarse modificaciones en la técnica ensayadas con los serotipos 1 y 5 se han podido eliminar estos inconvenientes. Es un proceso laborioso y complejo. (23, 24,31)

1.6.7 Fijación del complemento.

Originalmente fue concebida como un método de detección de especie transformado, después, como una prueba para determinar específicamente serotipo. Este ensayo se basa en la detección de antígenos específicos para cada uno de los 12 serotipos, el cual se hace reaccionar con el suero problema. Los antígenos son separados por sonicación de una suspensión de bacterias, recogiendo el sobrenadante. Además de los antígenos de App, requerimos la presencia del complemento, suero bovino fetal y el suero problema, los cuales son incubados durante la noche para la fijación del complemento. A la mañana siguiente se deben añadir los glóbulos rojos. La lisis de éstos, por la acción del complemento y el suero bovino, es el indicador del resultado de esta prueba. Cuando es encontrado en el suero porcino anticuerpos específicos del serotipo frente al antígeno interaccionaran con él y se unirán al complemento. Esto se encargará de agotar el complemento presente evitando así la lisis de los glóbulos rojos en el sistema de reacción. Por lo cual existirá una reacción inversa entre la presencia de anticuerpos frente a App y el lisado de las células rojas. La fijación del complemento tiene una sensibilidad del 90.6% y una especificidad de 98.7% por esto es inmunológicamente más específica que la prueba de hemaglutinación indirecta, porque es capaz de diferenciar entre App y *Haemophilus parasuis* sin embargo su validez para el serotipado es cuestionada; además la frecuencia de falsos negativos es elevada. El proceso de realización de esta prueba es laborioso y complejo, ya que requiere un elevado grado de estandarización para su éxito y con inconvenientes técnicos que lo implican.(23,24,31)

En la Fig. No.10. podemos observar una microplaca con la prueba ya realizada, en donde se ven glóbulos rojos sedimentados es porque la prueba fue negativa, donde no se observa esto quiere decir que fue positiva

Fig. No. 10. Prueba de fijación al complemento. (41).



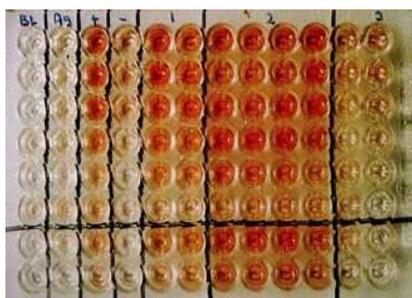
1.6.8 Elisa.

La utilización de ELISA en el serotipado de App. Fue propuesto inicialmente por Nicolet et.al., como alternativa a la fijación del complemento. Todos los intentos posteriores de optimizar los métodos ELISA se han centrado en la purificación de un antígeno específico de serotipo, lo que ha sido posible hasta la fecha. Primero se adaptaron los protocolos con el serotipo 5, que no presento dificultades porque tanto los polisacáridos capsulares, como el LPS y las proteínas de membrana externa resultaron ser antígenos específicos de ese serotipo. Recientemente se han descrito como antígenos, específicos de este serotipo los LPS de cadena larga. Actualmente, se dispone de sistemas basados en monoclonales específicos de antígenos del serotipo 5. (23,31)

Después del serotipo 5, fue estudiado el 1, pero es este caso los resultados obtenidos no han sido satisfactorios los polisacáridos capsulares del serotipo 1 reaccionaron cruzadamente con antisueros de los serotipos 9 y 11, al igual que ocurre con los LPS de cadena larga de la membrana. Esta reacción cruzada entre los serotipos 1, 9 y 11 fue demostrada también por Rodríguez Barbosa, et.al.; mediante la producción de anticuerpos monoclonales que señalaron la presencia de epítomos comunes en el LPS(24). De igual forma se han demostrado repetidamente las reacciones cruzadas entre los serotipos 4, 7 y *Actinobacillus lignieresii*. El análisis de cepas muestra que con frecuencia, son clasificadas erróneamente las cepas en un serotipo determinado en función del tipo de ELISA utilizado. Así, si el ELISA detecta al antígeno capsular, se puede clasificar en un serotipo diferente al que correspondería si el ELISA se basara en la reacción del LPS. Esto se ha demostrado con frecuencia en los serotipos 1,4 y 7; y se ha propuesto la utilización de Immunoblot para atenuar estos efectos adversos. La sensibilidad de esta prueba es de 99.7% y la especificidad de 90.6%. (11, 23, 24, 31).

La Fig. No. 11., nos muestra todo lo mencionado anteriormente para la realización de la prueba de ELISA.

Fig. No. 11. fotografía que muestra una prueba de ELISA. (41).



1.6.9 Inmunofluorescencia Indirecta.

Esté método fue utilizado en 1981, por Rodendal et.al. , para la identificación y serotipado de App. Es un procedimiento rápido y fácil de realizar, pero presenta numerosos inconvenientes. Se han detectado reacciones cruzadas del serotipo 6 con todos los demás; así como entre los serotipos 4 y 7 los serotipos 4 y 5. Además este método no sirve para detectar el serotipo 1; y tanto su especificidad como su sensibilidad son muy bajas. (11).

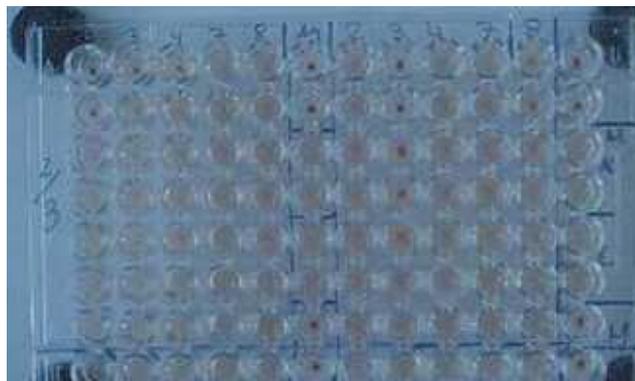
1.6.10 Precipitación en gel o inmunodifusión.

Se basa en la difusión de los antígenos y los anticuerpos en un gel de agar, con la consiguiente precipitación visible a la formación de complejos (por acción de ambos). Las ventajas de este método son la sencillez, de que puede ser utilizado tanto para la detección de antígenos como de anticuerpos y que permite la identificación y el serotipado. Sus desventajas son, la lentitud, pues requiere un período de incubación prolongado. Además resulta difícil la interpretación de las bandas de precipitación.(31).

1.6.11 Hemaglutinación indirecta.

Es una prueba más que detecta anticuerpos en suero y que ha sido utilizada durante muchos años como método de detección bacteriana. Primero fue utilizada por Nielsen y posteriormente por Mittal, los cuales perfeccionaron el método general de Herbert para su aplicación con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, detectando anticuerpos específicos de serotipo. La técnica comienza con la suspensión de las células bacterianas en solución salina durante la noche, centrifugado después y la recolección del sobrenadante. El extracto salino obtenido se incubaba una hora en presencia de glóbulos rojos de oveja, para que los antígenos bacterianos se absorban a la superficie de las células. Una vez preparadas se tapiza con ellas las placas de microtitulación y en los pocillos se añaden diluciones seriadas del suero. Las reacciones positivas se manifiestan como un sedimento plano y las negativas como un botón en el centro del pocillo (Fig. No. 12). El título de hemaglutinación es recíproco a la dilución más alta del suero que resultó positiva a la reacción. Nielsen ha demostrado que existe reacción cruzada entre los serotipos 6 y 8; aunque distingue entre los serotipos 4 y 7, lo que otros métodos no consiguen. También es posible diferenciar entre los serotipos 9 y 11, mientras que en el grupos 3, 6 y 8 pueden discriminarse los dos primeros. Sin embargo se presentan reacciones cruzadas con *Haemophilus parasuis*, por lo que la técnica es claramente cuestionable. De cualquier forma la hemaglutinación indirecta, es la técnica preferida por la mayoría por la sensibilidad y especificidad. (11, 23, 24, 31)

Fig. No. 12. Hemaglutinación directa. (41).



Algunos de los métodos antes mencionados se basan en la detección de anticuerpos contra cada uno de los antígenos presentes en los cerdos, con el fin de determinar el estado inmune de la granja y diferenciar aquellos cerdos que fueron vacunados de los infectados.

En México a partir de 1976, se observaron violentas epizootias de neumonía en granjas porcícolas del bajo y del estado de Tlaxcala. Estos se caracterizan por la elevada morbilidad (80-90%) y mortalidad (10-30%), que inicialmente afectó a los cerdos adultos y con el tiempo se fue quedando como una infección enzoótica de los lechones. La enfermedad no respondió al tratamiento usual con antibióticos ni con inmunizantes usuales a base de pasteurelas, estreptococos, corinebacterias y salmonelas. (24).

Debido a esto el Dr. Carlos Pijoan y colaboradores desarrollaron un Kit de diagnóstico serológico denominado PLEUROTTEST, conocido hoy en día como NEUMOTEST. (24, 27). Pleurotest/Neumotest consiste en un método rápido que no requiere equipo de laboratorio, se realiza en unos cuantos minutos y solo requiere de unos pocos mililitros de suero del animal a estudiar, por lo tanto no se necesita de personal clasificado. (11). El método rápido es un ensayo de diagnóstico serológico por medio de una prueba de aglutinación directa en placa que ofrece la única oportunidad de distinguir directamente en la propia granja porcícola si un cerdo ha sido infectado con Actinobacillus pleuropneumoniae de campo y por tanto es portador de pleuroneumonía contagiosa porcina o si el cerdo está sano o no vacunado contra PCP. (24)

Pleurotest/Neumotest es una prueba de aglutinación en placa destinada para identificar directamente los anticuerpos capsulares de Actinobacillus pleuropneumoniae contenidos en el suero del cerdo de cualquier edad. Pleurotest/Neumotest – pap está diseñado para en diagnóstico *in vitro*. Este método tiene una sensibilidad del 86% y una especificidad del 97%. (24)

1.7 Tratamiento y Prevención

Cuando se presenta un brote lo primordial es minimizar la severidad del cuadro clínico, prevenir la diseminación y evitar la recurrencia de la enfermedad. Se requiere una aplicación agresiva y a tiempo de antibióticos (preferentemente basados en un antibiograma): Primero inyectar a todos los animales enfermos como los susceptibles de enfermar, después realizar limpieza y desinfección exhaustiva de las áreas involucradas. (39). App es particularmente susceptible *in vitro* a penicilina. Ampicilina, cloranfenicol, cefalosporina, tetraciclinas, sulfonamida, clotrimazol, y gentamicina. (33).

Opciones inyectables:

Lapigen 50, Lapigen 100, Sulfatropin, Ampipen, Diramox, Estreptopen, Kanamix, Primecin, Minoxel 4 grs. y Minoxel plus. De acuerdo a la severidad del caso podrán combinarse algunos de los productos mencionados para obtener mejor respuesta. (39)

Es importante que además del antibiótico, para obtener una mejor respuesta, aplicar desinflamatorio- antipirético- antihistamínico no esferoidal (Flunidil) o al menos un analgésico antipirético (Lapirona). (39)

Opciones vía oral:

Sulfatropin, Primecin soluble y Kitakron 1000, etc. durante 3 a 5 días. Flortec Premix, pmezcla Tiaprem, Neumo 200, Neumoclor 200, Primecin Premix, Kitox, etc. solos o en combinaciones durante 10 – 15 días. (39).

1.7.1 Vacunación.

Se ha venido insistiendo repetidamente que la vacunación es un recurso importante y la disponibilidad de una vacuna eficaz contribuirá decisivamente al control de la enfermedad. A lo largo de los últimos años se han experimentado gran diversidad de combinaciones entre las que las toxinas Apx, han centrado la mayor atención. Muchos de estos productos proporcionan altos niveles de anticuerpos en los animales vacunados, que sobreviven a la infección. Pese a todo, en la práctica aún se carece de un producto que proteja frente a la enfermedad aguda y prevenga la condición de portador crónico y eliminador de App.

En México se utilizan los siguientes productos comerciales en contra de la PCP. Aquí (Tabla No.12.), se muestran las vacunas simples utilizadas en contra de App en México, donde se destacan los serotipos 1, 5, y 7 por ser los de mayor incidencia en México.

Tabla No.12.Vacunas Simples. (7,11).

Nombre comercial	fórmula	Vía de administración
Actinobac. Laboratorio HALVET	Cultivos inactivados de App serotipos I, II, V y VI + adyuvante	I.M. (intramuscular)
Suvaxy respifend App Laboratorio SOLVAY	Cultivos inactivados de App serotipos 1, 5 y 7 + Adyuvante	I.M.

En la Tabla No.13., podemos apreciar las vacunas mixtas que se utilizan en México para App, en donde se destaca la combinación con *Pasteurella multocida* A y D por ser un agente inmunosupresor, el cual se inutiliza para favorecer la entrada de App.(6).

Tabla No. 13.Vacunas mixtas. (7, 11).

Nombre comercial	formula	Vía de Administración
Bacterina triple porcina BHP. Caldo Laboratorio PECUARIUS.	Cultivos inactivados de : <i>Bordetella b</i> <i>Pasteurella multocida</i> A y D App serotipo I y V + Al(OH) ₃	I.M.
Haemo- shield P, PIER.	Cultivos inactivados de : App serotipos 1, 5 y 7. <i>Pasteurella multocida</i> A y D	I.M.

1.8 Control de la Enfermedad.

Si los tratamientos de prevención y control no resultan efectivos, convirtiéndose la enfermedad en un fenómeno incontrolable de tipo crónico, la solución debe ser la despoblación total, la aplicación de todas las medidas de bioseguridad y correctivos necesarios para luego repoblar. Por alto que sea o se pueda ver el costo de esta medida extrema de manera individual, al tomar en cuenta todo el sistema, es la más barata y efectiva. (24) Una vez la infección se ha establecido en la granja, es difícil de erradicar el agente infeccioso, aunque la granja esté clínicamente normal.

Control de factores ambientales:

- Evitar baja temperatura y baja humedad así como las fluctuaciones rápidas de temperatura.
- Reducir el número de microorganismos en el aire nebulizando desinfectantes en el aire.
- Mantener una buena ventilación y flujo de aire caliente con la finalidad de conseguir un ambiente en el que los cerdos estén calientes, secos y sin corrientes de aire.

Manejo de los animales:

- Aumentar los niveles de Vitamina E 50 -100 gramos / tonelada de pienso.
- Suministrar abundante agua.
- No mezclar animales de diferentes procedencias ni edades en los engordes siendo muy importante evitar mezclas de animales conocidos (mediante las pertinentes determinaciones serológicas o microbiológicas) como portadores y no portadores.
- Utilizar el sistema todo dentro - todo fuera de forma estricta. Adaptar las explotaciones a manejos en bandas a 3 semanas en función de la importancia económica de la enfermedad.

Inyectar todos los animales durante dos días al inicio de la enfermedad.

- Realizar medicaciones estratégicas con antibióticos antes y después de la época normal de expresión clínica. Considerar las medicaciones estratégicas como rutina dentro de los primeros 8 días después de introducirlos animales en el engorde.
- Considerar la **vacunación de reproductoras y engorde** durante una primera fase de dos años cuando una explotación se infecta por primera vez. (31). No obstante veamos la afirmación siguiente porque económicamente hablando se puede tomar la decisión de convivir con la enfermedad:

“En el caso de la pleuroneumonía porcina, lo primero es tomar una decisión de base: se requiere eliminar la infección o simplemente reducir los problemas y convivir con la infección. Los dos objetivos pueden ser válidos, dependiendo los gastos y el tipo de explotación. Obviamente, en el caso de los reproductores del pico de la pirámide y de los multiplicadores es indispensable una eliminación de la infección y un control estricto para evitar toda posible fuente de contaminación. Para ello, se debe utilizar la serología para evitar cualquier entrada de animales infectados. En granjas comerciales con signos clínicos agudos, es probablemente más rentable controlar la mortalidad y vivir con la infección. Para ello la vacunación es la metodología más rentable”.

2.0 JUSTIFICACIÓN.

Si la pleuroneumonía contagiosa porcina es una enfermedad devastadora con un fuerte impacto económico en la población porcícola y dentro de los factores de virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se encuentran las toxinas Apx. Si se logra identificar dicha toxina mediante un método electroforético, seguro, confiable, se podrán formular vacunas con alta especificidad que contrarresten el daño producido por esta bacteria en la población porcina.

3.0 HIPÓTESIS

El *Actinobacillus pleuropneumoniae*, es una bacteria que tiene presente en su estructura toxinas, las cuales mediante el cultivo de la bacteria se pueden extraer, y con la ayuda de liofilización y filtración tangencial se concentra a los sobrenadantes que contienen dichas toxinas; entonces con ayuda de una electroforesis podemos caracterizar cada una de las toxinas presentes, para los serotipos 1, 3, 5 y 7.

4.0 OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general:

Caracterizar toxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1, 3, 5 y 7 de sobrenadantes por método electroforético.

4.2 Objetivos particulares:

- Extraer toxinas Apx I, II y III de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
- Realizar liofilización y filtración tangencial para enriquecer los sobrenadantes que contienen las toxinas Apx I, II y III de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
- Elaborar una curva patrón de proteínas y cuantificarlas proteínas de las muestras por el método de Bradford.
- Utilizar geles de poliacrilamida para realizar el corrimiento electroforético como método de separación de proteínas.
- Analizar las bandas obtenidas en comparación con el marcador de peso molecular.

5.0 MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Lista de Reactivos.

Formaldehído
Soln. Amortiguadora de fosofatos (PBS).
Colorante Azul de Coomasie G-250
Soln. Estándar de albumina
Agua desionizada Reactivo de Bradford
Tris-HCl pH 6.8
Tris-HCl pH 8.8
Dodecil sulfato de sodio (SDS)
Acrilamida- Bis
Persulfato de Amonio 10%
TEMED
Soln. Digestora
Azul de Bromofenol
Glicina
Glicerol
Nitrato de plata
Ácido sulfúrico
Marcador de peso molecular

5.2 Material Biológico

Cepas de campo *App.*
Agar BHI
Agar PPLO
Skim milk
Staphylococcus aureus
Extracto de levadura al 20%
Sangre de cordero

5.3 Equipos

Centrífuga
Equipo para filtración Tangencial con membrana de 100 KDa
Liofilizadora
Estufa
Baño maría con agitación
Millipor filtros pellican
Espectrofotómetro
Cámara para electrofóresis

5.4 Ceba bacteriana.

Se utilizaron los serotipos 1, 3, 5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* provenientes de cepas de campo para la producción de sobrenadantes enriquecidos con exotoxinas Apx que fueron inactivados con formaldehído.

5.4.1 Obtención de la semilla.

Cultivo de los serotipos 1, 3, 5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Para su conservación las cepas bacterianas se mantuvieron en viales con caldo infusión cerebro corazón (BHI) adicionado con Skim milk al 15% en un criocontenedor con nitrógeno líquido a -196°C , después de descongelar a temperatura ambiente, las cepas bacterianas se sembraron en agar infusión cerebro corazón con una estría de cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, que proporcione el NAD necesario para su desarrollo, y se incubaron a 37°C durante 24 hrs.

5.4.2 Obtención de sobrenadantes ricos en toxinas Apx.

Del crecimiento inicial se tomaron varias colonias que se sembraron para su crecimiento masivo en agar PPLO adicionado con extracto de levadura al 20%. Este crecimiento masivo se utilizó para inocular 250 ml de caldo BHI adicionado con extracto de levadura al 20%. Se incubo a 37°C , con agitación e un baño de agua durante 24 hrs. Con este crecimiento se inoculo un garrafón de 10 litros de caldo BHI con extracto de levadura al 20% el cual se incubo a 37°C , durante 12 horas para evitar la destrucción de las toxinas Apx por la acción de las proteasas.

5.5 Inactivación con formaldehído.

Al crecimiento de 12 hrs. Se le adicionó formaldehído hasta obtener una concentración final de 0.5% esto se llevó a temperatura ambiente.

5.6 Filtración.

- a) Se eliminó la biomasa por centrifugación a 5000 rpm durante 30 minutos, conservando el sobrenadante.
- b) La filtración del sobrenadante se realizó con una membrana de $0.22\ \mu\text{m}$ para tratar de eliminar los restos de cuerpo bacteriano.
- c) Filtración de flujo tangencial con membrana de 100 Kda. En la filtración tangencial el flujo del fluido no se dirige en forma directa contra el filtro, se dirige de manera tangencial, evitando que el filtro se sature y permitiendo además tener un proceso alterno de concentración (equipo de filtración tangencial millipore/filtros pellicon).

Después de la filtración de flujo tangencial el sobrenadante quedó dividido en dos fracciones, un sobrenadante retenido que contuvo las moléculas de un peso mayor a 100 KDa en donde se encuentran las toxinas Apx. Cuyos pesos moleculares son de 103 KDa para Apx I, 105KDa para Apx II y 120 KDa para Apx III y un sobrenadante perneado que contiene las moléculas con un peso menor, que fue utilizado solo como control en posteriores procedimientos.

5.7 Concentración por liofilización.

El sobrenadante retenido se sometió a liofilización para concentrar las toxinas Apx. Se liofilizaron 100 ml de sobrenadante retenido en cada serotipo bacteriano resuspendiendo el polvo obtenido en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

5.8 Determinación de proteínas por el método de Bradford.

El método de Bradford es una prueba rápida y bastante sensible para la cuantificación de proteínas. Esta basada en la observación de que el colorante azul de Coomassie G-250 existe en dos formas coloridas diferentes, rojo y azul. La forma roja es convertida en azul tras la unión del colorante a proteínas. El complejo proteína- colorante tiene un elevado coeficiente de extinción lo que lleva a la gran sensibilidad en la determinación de proteínas. La unión del colorante a la proteína es un proceso muy rápido, aproximadamente 2 minutos, y el complejo colorante-proteína permanece estable en solución por un tiempo relativamente largo, aproximadamente 60 minutos, lo que hace de la técnica un procedimiento rápido y que no requiere de un tiempo crítico para su medición (3,5).

Para la determinación de proteínas por el método de Bradford se preparó una curva de calibración utilizando los reactivos en las cantidades que se incluyen en la tabla No. 14.

Tabla No. 14 Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de Bradford

TUBO	0	1	2	3	4	5	6
Solución estándar de albumina 0.01% en microlitros	--	10	20	40	60	80	100
Agua desionizada en microlitros	100	90	80	60	40	20	--
Reactivo de Bradford en microlitros	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Concentración de proteínas µg/ml	0	1	2	4	6	8	10

Para los problemas se utilizaron 100 µl de sobrenadante y se le adicionaron 1000µl del reactivo de Bradford.

A continuación los tubos se dejaron en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 595 nm.

5.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis es un método analítico-semipreparativo, en el que se prepara biomoléculas (32), en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico. Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos negativo y positivo), dependiendo de una combinación de su carga, peso molecular, (42) la poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, es capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible.

5.9.1 Preparación del gel de poliacrilamida.

- Preparación de un gel tapón.
- Preparación del gel de separación (la mezcla se vertió rápidamente a la cámara de electroforesis guardando una pequeña cantidad para observar el momento de la polimerización), se agregó el alcohol isopropílico sobre el gel y se retiró cuando ocurrió la polimerización, se enjuagó con agua desionizada para eliminar el exceso de alcohol y se secó con papel filtro. El gel de separación se preparó a una concentración de 10%.
- Preparación del gel de condensación (se adicionó sobre el gel de separación con cuidado y rapidez, guardando una pequeña cantidad para observar el momento de la polimerización), se colocó el peine el cual se retiró cuando el gel se polimerizó.

Los geles tapón, de separación y de condensación se prepararon de acuerdo a la Tabla No. 15.

Tabla No. 15. Preparación de geles de poliacrilamida-SDS. La concentración del gel de separación se selecciona en base al tamaño de las biomoléculas que se quieren identificar. Se utilizó una concentración del 10%.

Gel tapón		Gel de separación				Gel de condensación
		12%	10%	7.5%	5.0%	
Agua destilada (ml)	---	3.35	4.05	4.85	5.68	6.1
Tris-HCL, pH 8.8 (ml)	1.0	2.50	2.50	2.50	2.50	---
Tris-HCL, pH 6.8 (ml)	---	----	----	----	----	2.5
SDS 10%(µl)	100	100	100	100	100	100
Acilamida-Bis (ml)	2.0	4.0	3.3	2.5	1.67	1.3
Persulfato de amonio						
10% (µl)	50	50	50	50	50	50
TEMED (µl)	5	5	5	5	5	5

5.9.2 Preparación de las muestras para electroforesis.

Las muestras de los sobrenadantes liofilizados y resuspendidos de los serotipos 1, 3, 5 y 7 de App se diluyeron 1:4 con solución digestora y se colocaron en ebullición durante 4 minutos.

5.9.3 Corrimiento electroforético.

Se colocaron 25 µl de las muestras diluidas en los pozos formados en el gel, además de las muestras se corrió en un pozo un marcador de peso molecular. La corriente se fijó a 100 V y se trabajó a temperatura ambiente hasta que el colorante de referencia (azul de Bromofenol) llegó al extremo final del gel de corrimiento.

5.9.4 Tinción de proteínas en el gel de poliacrilamida-SDS.

Se separó el gel del vidrio y la placa que sirvieron como molde para formarlo y se sumergió en solución teñidora de 1 a 24 horas.

Después del tiempo requerido para la tinción de las proteínas, el gel fue sumergido en la solución desteñidora I, 2 horas con agitación ligera, por último el gel se transfirió a la solución desteñidora II.

5.9.5 Tinción con nitrato de plata.

1. Fijación 20 minutos

Solución fijadora:

Metanol 200 ml 50%
Ácido acético 40 ml 10%
Fijador concentrado 40 ml 10%
Agua desionizada 120 ml 30%

2. Enjuagué 20 minutos

- Decantar solución fijadora.
- Enjuagar los geles con 400 ml de agua desionizada (10 min.) con leve agitación.
- Decantar el agua.
- Reemplazar con agua desionizada para enjuagar (10 min.).
- Decantar el agua de lavado.

3. Tinción y revelación (20 minutos)

Solución desteñidora prepararse 5 minutos antes de utilizarse

35 ml. De agua desionizada

5 ml. De solución de plata
5 ml. De solución moderadora de reducción
5 ml. De reactivo desarrollador de imagen

Inmediatamente antes de usar añadir rápidamente 50 ml de solución aceleradora.
Añadir el contenido al recipiente de tinción teñir con leve agitación.
Teñir los geles 20 minutos o hasta que se alcance la intensidad de tinción deseada.
Después de la tinción deseada colocar los geles en ácido acético al 5% para detener la reacción (aprox. 15 minutos).

6.0 RESULTADOS

6.1 Determinación de proteínas por el método de Bradford.

Se llevó a cabo la preparación de una curva de calibración mediante la cual se cuantificó la concentración de proteínas que se obtuvo de los sobrenadantes de los cultivos de los serotipos 1, 3, 5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En la Fig. No. 13 se observa los tubos preparados para la curva de calibración.

Fig. No. 13. Sistemas de la curva de calibración.



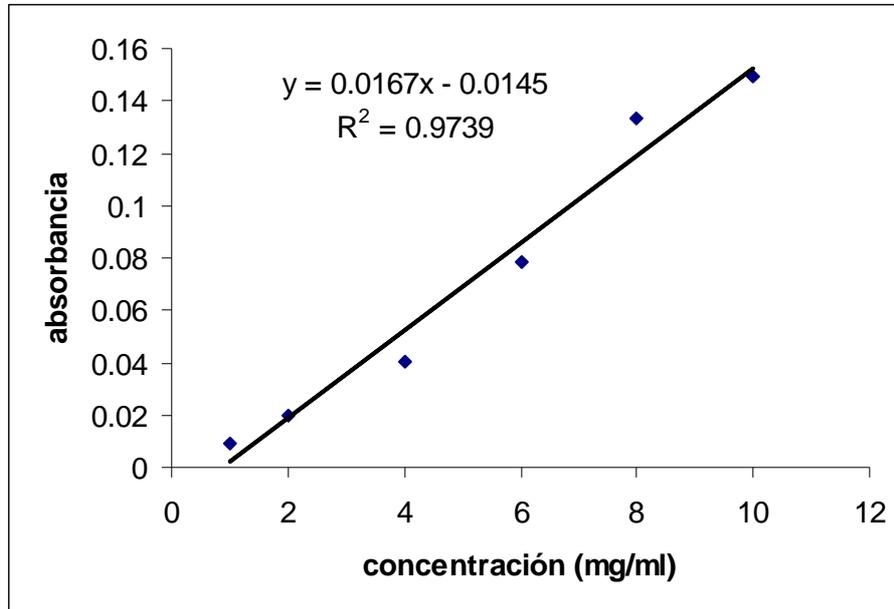
Las muestras se diluyeron 1:400 para que los valores de sus absorbancias quedaran dentro de la curva de calibración. Los resultados de las absorbancias de la curva de calibración y las muestras problema se incluyen en la siguiente Tabla No.15.

Tabla. No.15. Absorbancias registradas para la curva de calibración y la muestras de toxinas Apx..

	REPETICIONES			Promedio D estándar	
	A	B	C		
Tubo curva de calibración					
1	0.009	0.009	0.009	0.009	0.004
2	0.018	0.019	0.019	0.019	0.005
3	0.037	0.043	0.041	0.040	0.003
4	0.080	0.075	0.081	0.078	0.003
5	0.129	0.136	0.134	0.133	0.003
6	0.144	0.153	0.150	0.149	0.004
Sobrenadante serotipo					
App 1	0.086	0.096		0.091	0.007
App 2	0.103	0.111		0.107	0.005
App 3	0.091	0.122		0.106	0.021
App 4	0.116	0.130		0.123	0.009

La absorbancia de las muestras se midió a 595nm.

Fig. No. 14 Gráfico correspondiente a la curva de calibración.



Con los datos y el gráfico obtenido fue posible determinar la concentración de proteínas en los sobrenadantes de las muestras de App. 1, 3, 5 y 7. Los resultados se muestran en la tabla No. 16.

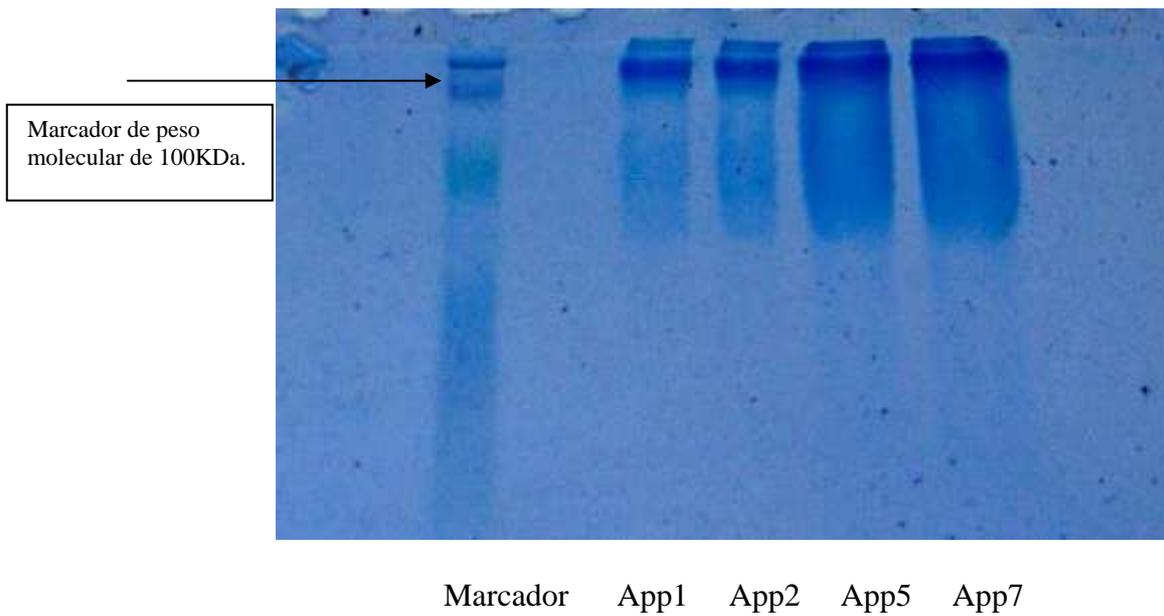
Tabla No.16. Concentración de toxinas Apx.

SOBRENADANTE	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS
1	6.018 mg/ml
3	7.036 mg/ml
5	6.317 mg/ml
7	7.817 mg/ml

6.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se realizó un corrimiento electroforético para los sobrenadantes de App. 1, 3, 5 y 7. el cual fue teñido con Azul de coomasie. El gel obtenido se muestra en la Fig. No. 15.

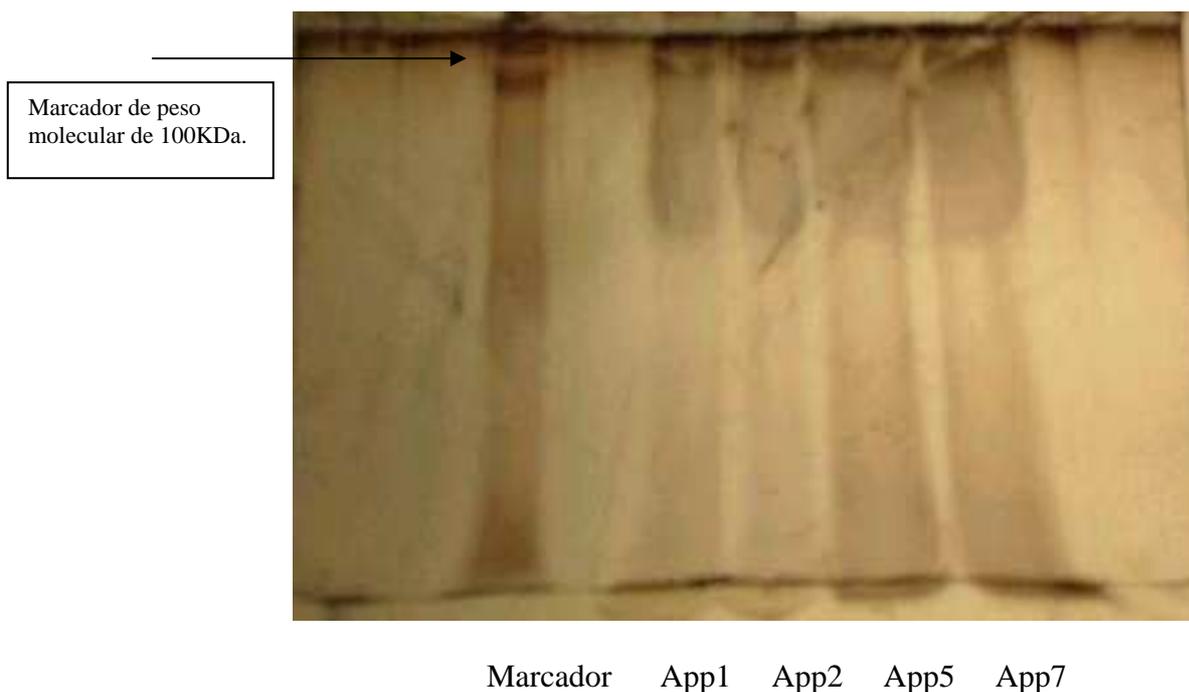
Fig. No. 15. Gel con tinción azul de Coomasie.



Con ayuda de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS fue posible identificar bandas cerca del marcador de 100 KDa para todos los sobrenadantes.

Se realizó también una tinción con nitrato de plata (Fig. No. 16), con el cual se reiteró la presencia de proteínas Apx.

Fig. No. 16. Tinción con nitrato de plata.



7.0 Discusión

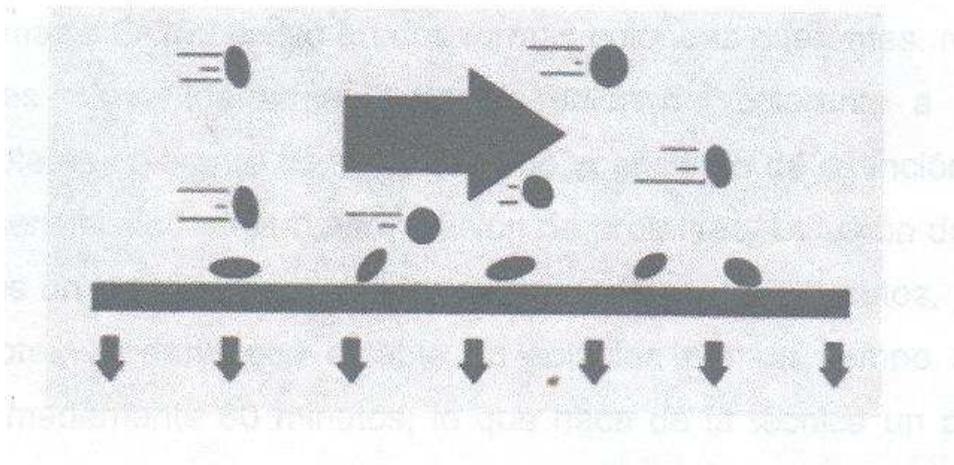
El *Actinobacillus pleuropneumoniae* es una bacteria que tiene entre otros factores de virulencia toxinas Apx I, II y III, como se sabe funcionalmente son porinas, ya que producen poros en las membranas celulares, principalmente de macrófagos y neutrófilos provocándoles la muerte por ello la bacteria tiene actividad citotóxica y hemolítica; dichas toxinas por ser endotoxinas se pueden obtener de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas bacterianas que las producen, por lo que se puede esperar encontrar las 3 toxinas al utilizar el serotipo 1 (productor de toxinas Apx I y II), 3 (productor de toxinas Apx II y III), 5 (productor de toxinas Apx I y II) y 7 (productor de toxina Apx II). De acuerdo al crecimiento de la bacteria esta debe ser inactivada a las 12 horas, para evitar la degradación de la toxina.

Este método de cultivo de la bacteria ha sido utilizado en otros experimentos y se ha encontrado que es una buena técnica para obtener la cantidad de toxina suficiente para ser utilizada en las pruebas que se requiera.

La finalidad de la filtración de flujo tangencial es la de eliminar todas aquellas moléculas cuyo peso molecular sea menor a 100 Kda y conservar solo aquellas con un peso molecular mayor a 100 KDa ; en donde esperamos encontrar las toxinas Apx I (PM. 105 KDa), Apx II (PM 103 KDa) y Apx III (PM 120KDa).

En la Fig. No. 17 podemos observar como se lleva a cabo la filtración, la flecha más grande indica la dirección del flujo del fluido, esto evita la saturación de la membrana ya que las partículas de mayor tamaño son arrastradas por el flujo evitando acumularse en la superficie del filtro, las flechas pequeñas indican como las moléculas de menor tamaño atraviesan la membrana para poder ser recolectadas; se tiene reportes de que la filtración tangencial es utilizada en un sin fin de experimentos dentro de la industria química.

Fig. No. 17 filtración Tangencial.



La liofilización permitió concentrar los sobrenadantes ya que partimos de un volumen inicial de 100 ml., el material liofilizado se resuspendió en un volumen final de 10 ml.

La determinación de proteínas por el método de Bradford, fue utilizada para conocer la concentración de toxinas en los sobrenadantes; este método es sensible y rápido y nos permite establecer de manera indirecta la cantidad de toxinas Apx presentes en las muestras (sobrenadantes). La concentración de proteínas reportada en la tabla nos muestra que se encuentra una buena cantidad de toxina y con esto podemos tener una buena separación electroforética.

La electroforesis en gel de poliacrilamida; es un método analítico que permite separar biomoléculas dependiendo de una combinación de su carga y peso molecular se utilizó para tratar de identificar proteínas con un peso molecular cercano a los 100KDa.

Para llevar a cabo una electroforesis necesitamos contar con tres geles. El gel tapón, gel de separación y el gel condensador. El primer gel ('stacking') es de mayor poro (menor porcentaje de acrilamida+bisacrilamida) y tiene un pH más ácido que el segundo gel que es el que realmente separa las proteínas. Este sistema es especialmente adecuado para analizar muestras diluidas sin perder resolución.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking'), la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^-$) que se añade en forma de persulfato de amonio.

La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador). La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use. El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño. En este caso se utilizó al 5% de acrilamida/bisacrilamida. En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturalizado) a lo largo del proceso electroforético éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes. Una electroforesis desnaturalizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturalizante más empleado es el dodecilsulfato de sodio o SDS, un detergente.

Las tinciones utilizadas para el gel de corrimiento fueron azul de coomasie y nitrato de plata; esta última es un método muy sensible pues detecta bandas aunque haya poca concentración de la muestra, pero por ello es un método de tinción que requiere un especial cuidado, ya que dentro de los riesgos que se corren es el de que todo el gel se oscurezca y no poder apreciar nada; ambas tinciones permitieron identificar las bandas marcadas por las toxinas Apx; las cuales aparecieron cercanas al marcador de peso molecular de 100 KDa para los 4 serotipos utilizados. Esto nos hace pensar que en los sobrenadantes están presentes las toxinas Apx I, Apx II y Apx III.

Se han realizado estudios similares donde se identifican las toxinas de App, uno de ellos es el de Kamp y colaboradores (19), donde se utiliza un Western blot (es el paso que sigue a partir de una electroforesis), para la identificación de las toxinas y las comparan con toxinas de *Actinobacillus suis*.

Este tipo de estudios son de gran valor ya que se pueden realizar investigaciones en donde se purifiquen a las toxinas y se puedan realizar posible vacunas que sean de gran utilidad y talvez se logre también a un bajo costo para el comprador, y a sí poder tener un mejor control y prevención de la enfermedad

Logrando con ello que la gente que se dedica al ámbito porcino pueda tener más remuneraciones que pérdidas en sus granjas, pues cuando existe un problema de pleuroneumonía contagiosa porcina, son grandes pérdidas económicas para las granjas.

8.0 CONCLUSIONES

Después de realizar el presente trabajo se llegaron a las siguientes conclusiones:

- ⇒ A partir de los sobrenadantes de App. serotipos 1, 3, 5 y 7 se obtuvieron las toxinas Apx I se encontró en los serotipos 1 y 5 ; está es una Proteína de 105 KDa. de peso molecular La cual es fuertemente hemolítica y ligeramente citotóxica, Apx II tiene un peso molecular de 103 KDa. es ligeramente hemolítica y ligeramente citotóxica se obtuvo de los cuatro sobrenadantes (serotipos 1, 3, 5 y 7) y finalmente en los serotipos 2 y 3 encontramos a Apx III, proteína de un peso molecular de 120 KDa. La cual no es hemolítica pero es fuertemente citotóxica.
- ⇒ La utilización de electroforesis es un buen método de separación para la identificación de las toxinas Apx.
- ⇒ La pleuroneumonía contagiosa porcina (ocasionada por App), es una de las enfermedades respiratorias más nocivas dentro de las granjas porcinas, ya que tiene gran impacto por la alta mortalidad entre los animales, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria porcina.
- ⇒ Es de suma importancia identificar los diferentes serotipos que se presentan tanto en el país como la región o estado, ya que de esto dependerá realizar una buena inmunización y buenos tratamientos, así como poder tomar las mejores medidas de prevención.
- ⇒ Con el cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y a partir de sus sobrenadantes se pueden obtener las toxinas Apx, las cuales para concentrar utilizamos métodos tales como la liofilización y la filtración tangencial, obteniendo buenos resultados.
- ⇒ Con el conocimiento de las toxinas Apx, se pueden realizar estudios en donde a partir de éstas, se puedan desarrollar, nuevos medicamentos o vacunas que ayuden a la prevención y el control de la pleuroneumonía contagiosa porcina.

9.0 REFERENCIAS.

1. BAGDASARAIN, M., NOGAL, M., Frey. (1998), *Inmunogenicity of Actinobacillus Apx 1 Toxin epitopes fused to the E. coli heat – labile enterotoxin B subunit*, Vaccine, 17, pp. 441 - 447.
2. BAUER, M. WELCH, R.,(1996), *Association of RTX Toxins with erythrocytes*, Infection and immunity, 64 pp.4665 – 4672.
3. BIBERSTEIN, D.V.M., PH. D. Zee. CHUNG YUANG ,D.V.M.PH.D.(1994), *Tratado de microbiología veterinaria*, Zaragoza España,Acribia. pp. 207- 212.
4. BOLETÍN 103 de www.exopol (Investigación de Marcelo Gottschalk, DVM, PhD, Profesor, facultad de Medicina Veterinaria, universidad de Montreal Québec, Canadá)
5. BRADFORD, M., (1976), *A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analitical biochemistry, 72 pp. 248-254.
6. BURNS L. Drusilla, BARBIERI, Joseph T. IGLEWSK H. Barbara. RAPPUOLI Rino, (2003), *Bacterial Protein Toxin*, Washington D.C., ASM Press. pp. 203-214.
7. CARRERA, R.E. (1995), *Inmunización en el cerdo estudio recapitulativo*, UNAM., Facultad de MVZ.
8. COWAN, S.T., and STEEL,J., (1974), *Manual for identification of medical bacteria*, 2th edition. Cambridge Univ. Press. 238p.
9. DAVIES, R., CAMPELLS, S., WHITTAM, T.,(2002), *Mosaic structure and molecular evolution of the leokotoxin operon(IKFCABD) in Mannheimia (Pasteurella) haemolytica, Mannheimia glucosida, and Pasteurella trehalus*, Journal of bacteriology, 184,pp. 266 – 277.
10. DUBREUIL, JD., JAQUES, M., MITTAL, KR. and GATTSCALK M., (2000), *Actinobacillus pleuropneumoniae surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity*, Animal health research reviews.1(2), pp.73 – 93.
11. ESCOBAR LÓPEZ, Héctor, (2003), *Inmunología veterinaria aplicada, respuesta inmune contra Actinobacillus pleuropneumoniae*, México, p.,Tesis (Médico Veterinario Zootecnista), UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
12. FREY, J., PERRIN, J. and NICOLET, J.,(1993), *Actinobacillus pleuropneumoniae RTX-Toxins: uniform designation of haemolysin, cytolysins, Pleurotoxin and their genes*, Journal of General Microbiology, 139, pp.1723 – 1728.

13. GARIBAY, E.S., (1992) “*Apéndices extracelulares de Actinobacillus pleuropneumoniae aislados de casos agudos de pleuropneumonia contagiosa porcina*”, México, p. Tesis (Químico Farmacéutico Biólogo), UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
14. GOETHE, R., FLORES, O., LINDNER, T., GERLACH, G., (2000), *A novel strategy for protective Actinobacillus pleuropneumoniae subunit vaccines: detergent extraction of cultures induced by iron restriction*, Vaccine, 19, pp. 966 – 975.
15. HABRUN, B., BILIC, V., CVETNIC, Z., HUMSKI, A., BENIC, M., (2002), *Porcine pleuropneumoniae: the first evaluation of field efficacy of a subunit vaccine in Croatia*, Vet. Med. Czech., 47, pp. 213-218.
16. HENSEL, A., STOCKHOFF-ZORWIEDEN, N., PETZOLDT, K., LUBITZ, W., (1995), *Oral Immunization of pigs with viable or inactivated Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 9 induces pulmonary and systemic antibodies and protects against homologous aerosol challenge*, Infection and Immunity, 63, pp. 3048 – 3053.
17. HOLTS, Otto, (2000), *Bacterial Toxins, Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, USA, Humana Press, 145, pp. 289.
18. HUNTER, V., HENSEL, A., BRAND, E., Lubitz, W., (2000), *Improved protection against lung colonization by Actinobacillus pleuropneumoniae ghosts; characterization of a genetically inactivated vaccine*, Journal of Biotechnology, 83, pp. 161 – 172.
19. KAMP, E.M., VERMEULEN, T.M., SMITS, M.A. and HAAGSMA, J. (1994), *Production of Apx toxins by Field Strains of Actinobacillus Pleuropneumoniae and Actinobacillus suis*, Infected Immun, 62(9), pp. 4063 – 4065.
20. KONEMAN, M.D. Elmer. Et.al. (2001), *Diagnóstico Microbiológico, texto y atlas*, 5.ed., España, Médica Panamericana, 1432p.
21. Lally, E. Blake, R., Kieba, I., Korostoff, J., 1999. *The interaction between RTX Toxins and target cells*. Trends in Microbiology, 7:356 – 361.
22. LARA PUENTE, Jesús Horacio, (2002), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Expertise Boehringer Ingelheim. 1(7), pp. 1 – 4.
23. LO, MT. *Detection and identification Of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 5 by multiplex polymerase chain reaction*, Tesis, submitted to the faculty of the Virginia polytechnic institute and state university in partial fulfillment of the requirements for the degree, 112p.
24. MENDOZA ELVIRA, Susana, CIPRIAN, Abel, (2001), *Tercer ciclo nacional “Enfermedades respiratorias del cerdo”*, México D.F., UNAM., pp. 75 – 84 y 100 – 111.

25. MONTELONGO HERRERA, Vladimir, (2005), *Estudio de la enfermedad de Glasser causada por Haemophilus parasuis en México con la técnica cric- pr como método de diagnóstico*. México, p . Tesis (Químico Farmacéutico Biólogo), UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán .
26. PEREZ, G.I., *Procesos respiratorios en el cebo porcino: factores predisponentes y etiológicos* , Ciencias veterinarias.
27. PIJOÁN AGUADÉ, Carlos, RAMÍREZ NECOECHEA, Ramiro, (1987), *Enfermedades de los cerdos*, Diana Técnico, pp. 275 – 278.
28. PLOTAIT Hans, BICKHARD Klaus, (2001), *Manual de las enfermedades del cerdo*, Zaragoza España, Acribia, pp. 137 – 140.
29. PRIDEAUX, TCH., (2000), *Usig live genetically modified Actinobacillus pleuropneumoniae strains, to immunize against disease. the 16 th international pig*, Melbourne Australia ,Veterinary society congress, pp.434 – 442.
30. RAMÍREZ RIVAS, Ernestina (1997). *Efecto del pH en el patrón electroforético de las proteínas intrínsecas de membrana del App 1*, México, p. Tesis (Químico Farmacéutico Biólogo), UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
31. RODRÍGUEZ FERRI, E.F., *Caracterización y Prevalencia de cepas de Actinobacillus pleuropneumoniae en España*.(2002), Anaporc
32. ROITT, Ivan, M. DELVES, Peter J., (2003) *Inmunología Fundamentos*, 10 ed. Buenos Aires Argentina, Editorial médica Panamericana, pp.
33. TAYLOR D. J., (1999), *Diseases of swine Actinobacillus pleuropneumoniae*, 8th. pp. 343-354.
34. TORRES, L. M. A., RAMÍREZ, P. R. G.(1999).*Enfermedades de los porcinos diagnosticadas en la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la universidad Autónoma de Yucatán durante los años de 1988 – 1997*.Rev. Biomed, 10, pp. 93 – 101.
35. TORRES, L. M., Williams, J. de J. CASTRO A F. J., SALAZAR, F. M. del R (2000). *Frecuencia de Rinitis Atrófica y grado de lesión de los cornetes nasales de cerdos en Yucatán, México*. Rev. Biomed, 11 , pp.99-105.
36. VARGAS S., A. (año) ,*Impacto de las enfermedades respiratorias en las granjas porcinas*, México, 2-63p. Tesis (Químico Farmacéutico Biólogo), UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
37. WEI, liao, Ch., CHIOU, H., YEH, K., CHEN, J., WENG, ch, (2002), *Oral immunization using formalin – inactivated Actinobacillus pleuropneumoniae antigens entrapped in microspheres with aqueous dispersion polymers prepared using a co spray drying process*. Preventive veterinary Medicine, 61, pp. 1 - 15.

38. www.exopol.com/general/circulares/89circ.html. RODRÍGUEZ, Ferri F. Elías (2002). Sobre la participación bacteriana en algunas enfermedades respiratorias del cerdo. [En línea] 12 Enero 2007.
39. www.lapisa.com/pleuroneumonia.html. OROZCO, Víctor (2006). Pleuropneumonía Contagiosa. [En línea] 22 Diciembre 2006.
40. www.pfizerah.com.mx/health.asp. SCOTT, A. D. (2005) [En línea] Universidad de Minesota , Diciembre 2006.
41. www.sanidadanimal.info/curso/etiologia.htm. RODRIGUEZ FERRI, E. F.Barceló, J.(2003) *Actinobacillus pleuropneunoniae* [En línea] febrero 2007.

Anexos

Preparación de soluciones utilizadas en la electroforesis.

1) Amortiguador TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8

Tris base6.8 grs.

Agua desionizada.....60 ml

Ajustar pH a 6.8 con HCl 1N

Llevar a 100 ml. Com agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C.

2) Amortiguador TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8

Tris base.....18.75grs.

Agua desionizada80 ml.

Ajustar pH a 8.8 con HCl 1N

Llevar a 150 ml con agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C.

3) Acrilamida- Bis 30%

Acrilamida29.2 grs.

Bis.acrilamida.....0.8 grs.

Llevar a 100 ml con agua desionizada, filtrar y almacenar a 4°C . En oscuridad (máximo 30 días)

4) Persulfato de amonio al 10%

Persulfato de amonio.....0.1 grs.

Disolver en 1 ml. de agua desionizada

5) SDS 10%

Dodecil sulfato de sodio.....1.0 grs.

Llevar a 10 ml con agua desionizada

6) Solución amortiguadora de corrida pH 8.3

Tris- base.....4.5 grs.

Glicina.....21.6grs.

SDS.....1.5grs.

Disolver en 300 ml. de agua desionizada, almacenar a 4°C. Calentar antes de usar si es que ocurre precipitación. Diluir 60 ml. de esta solución en 240 ml. de agua desionizada para un corrimiento.

7) Solución digestora

Tris 0.5 M pH 8.6.....1.0 ml.

Glicerol.....0.8 ml.

SDS 10%.....1.6 ml

2-b-mercaptoetanol.....0.4 ml.

Azul de bromofenol.....0.2 ml.

Agua desionizada.....4.0 ml.

8) Solución teñidora

Azul de coomasie..... 2.0 grs.

Agua desionizada.....200 ml.

9) Solución desteñidora I

Metanol50 ml.

Ácido acético.....10 ml.

Aforar a 100 ml. con agua desionizada

10) Solución desteñidora II

Ácido acético.....7 ml.

Metanol.....5 ml.

Aforar a 100 ml. con agua desionizada.