



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**AISLAMIENTO DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
DE PULMONES Y TONSILAS DE CERDO**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A:  
FIDEL OMAR SÁNCHEZ VILLARAÚZ.

**ASESORES: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Dedicatorias.

### A ti Mamá:

Por que nunca dejaste de confiar en mí y me impulsaste cada día al máximo con tus bendiciones, sacrificios, lágrimas y amor para hoy tener una profesión.

### A ti Papá:

Por que a pesar de que la vida y los diferentes pasajes del destino no nos dejaron estar juntos, tu amor, apoyo y confianza estuvieron en todo momento.

## Agradecimientos.

A mis hermanos:

Goyo<sup>†</sup>.- Aunque la vida no nos dio el tiempo suficiente para convivir hoy eres parte fundamental de este triunfo.

Wiwot.- Gracias por tu apoyo, paciencia y confianza, por estar cuando te necesito, por ser una hermana grandiosa.

Marcos y Diego.- Porque cada momento que paso con ustedes me alienta para ser mejor.

Doda y Uriel.- Por llevarme en sus corazones.

A Pedro Caso B<sup>†</sup>:

Por enseñarme el valor y lo duro que significa crecer para ser el mejor.

A ti Nana:

Porque me brindas tu amor, tu paciencia, tu corazón, tu apoyo en todo momento, por estar junto a mí y no dejarme caer cuando tropiezo, por permitirme alcanzar mis sueños y dejarme soñar a cada instante, por creer en mí, por dejarme ser parte de tu vida estos años y por cada sonrisa de aliento corazón.

Gracias

A la Dra. Susana.- Por darme la oportunidad de participar en sus proyectos, por sus consejos y amistad que me orientaron para ser un profesional y por ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. Abel.- Por su amistad y ese entusiasmo que contagia para hacer las cosas bien y alentarme para ser un profesional.

A mis Sinodales.- Porque sin sus enseñanzas no sería un profesional.

A aquellas personas que confiaron en mí, por estar en las buenas y las malas con risas y llantos aconsejándome en todo momento gracias Marcos (toño), Dr. José Fugarolas Marín, Jair, Sergio R., Isaac, J. Carlos, Gerson, Gaby, Güera, Ángeles y Chule y a todos aquellos que de algún modo participaron en esta odisea.

Al Sr. Gabino Sánchez.- Por su amistad y apoyo en todo este tiempo.

Al M.V.Z. David Trujillo.- Por su amistad y asesoría en computación.

Al Ing. Draucin Celis.- Por su apoyo técnico.

I. Resumen.....	i
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.....	1
1.2 Agente Etiológico.....	4
1.3 Epidemiología de la PCP.....	6
1.4 Cápsula.....	9
1.5 Fimbrias Adherentes.....	10
1.6 Lipopolisacárido.....	10
1.7 Proteína de Membrana Externa.....	12
1.8 Exotoxinas.....	13
1.9 Pleurotoxina.....	15
1.10 Mecanismos de Resistencia Pulmonar.....	15
1.11 Mecanismos Inespecíficos.....	18
1.12 Distribución Geográfica.....	20
1.13 Diagnóstico.....	21
1.14 Métodos de diagnóstico.....	23
1.15 Tratamiento.....	25
1.16 Justificación.....	28
1.17 Hipotésis.....	28
2. OBJETIVO GENERAL.....	29
2.1 Objetivos Particulares.....	29
3. MATERIAL Y METODOS.....	30
3.1 Animales.....	30
3.2 Medios de cultivo.....	30
3.3 Necropsia.....	30
3.4 Aislamiento.....	30
3.5 Diagrama.....	32
3.6 Identificación.....	33
4. RESULTADOS.....	34
5. DISCUSION.....	40
6. CONCLUSIONES.....	44
7. REFERENCIAS.....	45

## INDICE DE

### TABLAS

	Pág.
a. <b>Tabla N° 1.</b> Principales pruebas bioquímicas de <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	33
b. <b>Tabla N° 2.</b> Número de animales positivos al aislamiento de <i>App</i> en tonsilas y pulmones .....	38
c. <b>Tabla N° 3.</b> Relación de aislamiento en tonsilas y pulmón.....	39
d. <b>Tabla N° 4.</b> Porcentaje de aislamiento en tonsilas y pulmones.....	39

### FIGURAS

e. <b>Figura 1.</b> Lesión típica de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	34
f. <b>Figura 2.</b> Proceso para toma de muestra de pulmón.....	35
g. <b>Figura 3.</b> Esterilización del área afectada.....	35
h. <b>Figura 4.</b> Sembrado del tejido sospechoso.....	36
i. <b>Figura 5.</b> Colocación de cepa nodriza en agar sangre.....	36
j. <b>Figura 6.</b> Prueba de satelitismo.....	37

### GRAFICOS

i. <b>Diagrama de flujo.</b> Secuencia del aislamiento de <i>App</i> a partir de pulmones y tonsilas.....	32
---	----

## ABREVIATURAS

<b>ADN.</b>	Acido Desoxirribonucléico
<b>App.</b>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
<b>cm.</b>	Centímetros
<b>Kd.</b>	Kilodalton
<b>Kg.</b>	Kilogramo
<b>LPS.</b>	Lipopolisacárido
<b>μm.</b>	Micrómetros
<b>mm.</b>	Milímetros
<b>NAD.</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
<b>PCP.</b>	Pleuroneumonía contagiosa porcina
<b>PME.</b>	Proteínas de membrana externa
<b>PMN.</b>	Polimorfonucleares



## Resumen

El objetivo del trabajo fue relacionar la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en tonsilas y pulmones de cerdo mediante el aislamiento de dicho microorganismo. Las muestras analizadas se tomaron de una granja ubicada en Nuevo León donde se presentó un brote con signología característica de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP); se procedió a tomar muestras de 50 animales en etapa de crecimiento. Se recolectaron los pulmones y tonsilas de dichos animales para el aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) a partir de sitios con lesiones características producidas por este microorganismo. Este tejido se sembró en medios de cultivo especiales para el crecimiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* incubándose por 24hrs a 37°C. Transcurrido este tiempo se observaron las colonias presentes para identificar las características morfológicas propias de App, posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas que confirmaran el aislamiento de este microorganismo. Los resultados mostraron la relación existente entre el aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en tonsilas y pulmones, si *Actinobacillus pleuropneumoniae* se aísla de pulmones el microorganismo se va a encontrar también en tonsila, pero si *Actinobacillus pleuropneumoniae* se aísla de tonsila no necesariamente se encuentra en pulmones.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

En la actualidad, la insuficiencia de alimentos a nivel mundial a estado obligando a los productores de cerdos a incrementar su producción para poder cubrir esta demanda que esta aumentando. Los avances de la industria porcina se pueden encontrar en cualquier renglón: nutrición instalaciones, genética, manejo y diagnóstico pero para el área de sanidad (enfermedades), continua siendo una gran limitante<sup>32</sup>.

Las enfermedades respiratorias del cerdo ocupan un lugar muy importante dentro de los factores responsables de disminuir la productividad en la industria porcina y con eso, mermar la rentabilidad del negocio pecuario<sup>32</sup>.

La Pleuroneumonía Porcina es causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, bacteria gram negativa antes conocida como *Haemophilus pleuropneumoniae*, que aún es nombrado así en algunas partes del mundo. Existen varios serotipos, algunos más virulentos que otros. La enfermedad se transmite por contacto directo de cerdo a cerdo. La transmisión por aire puede ser importante, sobre todo cuando existe una sobrepoblación de cerdos<sup>12,26,30</sup>.

La PCP (pleuroneumonía contagiosa porcina) es causado por *A. pleuropneumoniae*, una enfermedad devastadora, causa grandes perdidas económicas, debido a su alta mortalidad y a la pobre conversión alimenticia en animales con infección crónica. Los cerdos con mayor susceptibilidad son las pjaras que van desde los 2 a 6 meses de edad<sup>10</sup>.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* tiene una alta especificidad por el cerdo, al parecer es ocasionada porque el cerdo en su epitelio de la mucosa respiratoria (tonsila) posee receptores para las fimbrias citoadherentes, la bacteria se adhiere a la mucosa y no puede ser removida, la vacunación solo disminuye la mortalidad, pero no previene la enfermedad. Ya que los cerdos pueden volverse a infectar y presentar una infección subclínica o crónica<sup>1,17,18,32,33</sup>.

La extrema virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se debe a la presencia de su cápsula y a la producción de citotoxinas y endotoxinas (toxinas

bacterianas liberadas cuando se rompe o muere la bacteria). Como las bacterias se reproducen y mueren rápidamente, las endotoxinas bacterianas se liberan en el cerdo creando una endotoxemia generalizada<sup>18</sup>.

La enfermedad se presenta en cualquier edad siendo más frecuente en cerdos de engorda entre los 25 y 85 Kg de peso. La incidencia es variable y no es muy común observar una frecuencia mayor al 50%. Sin tratamiento adecuado y a tiempo la mortalidad es alta. La presentación crónica de la enfermedad, cerdos que se enfermaron, se trataron y recuperaron no muestran signos clínicos. Sin embargo pueden ser portadores del microorganismo y transmitirlo de hato a hato. Esto se encuentra típicamente con el hato reproductor y/o reemplazos que se compran. Otra posible forma de transmisión aún no bien definida puede ser por diferentes vehículos como botas y neumáticos de camiones<sup>17, 18,19</sup>.

Es importante conocer acerca del comportamiento clínico de esta enfermedad, bajo condiciones tropicales, así como también completar la información referente a las características bioquímicas, morfológicas y de cultivo de las cepas aisladas, siendo un apoyo fundamental para el diagnóstico bacteriológico confiable de la pleuroneumonía porcina<sup>30</sup>.

La PCP es una enfermedad fulminante; ataca en tan solo cuatro horas a una piara completa y puede acabar hasta con un 90% de esta provocando serias mermas en las producciones, retraso en el periodo de engorda, altos costos por consumo de medicamentos y requerimiento de asistencia veterinaria. La enfermedad puede variar desde un curso hiperagudo hasta el crónico, en donde la lesión aguda característica es una neumonía hemorrágica necrosante, asociada a una pleuritis fibrinosa, mientras que la lesión crónica se distingue por un tejido pulmonar consolidado, infartado y encapsulado<sup>5</sup>.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* fue identificado originalmente como *Haemophilus parahaemolyticus* en 1978, después de su identificación bioquímica y sus características de crecimiento entre cepas de origen porcino y humano, Filian y col. Propusieron una cepa neotipo, Shope (4074), llamada *Haemophilus pleuropneumoniae*<sup>22</sup>.

La dispersión de la bacteria es por vía aérea y el contagio de los cerdos es por contacto directo, lo que causa la muerte de animales de cualquier edad y aquellos que sobreviven se convierten en portadores crónicos. La infección propicia una enfermedad respiratoria cuya presentación puede ser aguda o

crónica dependiendo de diferentes factores como: inmunidad de la pira, vacunación, medicación y condiciones ambientales. La forma aguda de la enfermedad se caracteriza por hemorragia extensiva y deposición de fibrina en los pulmones<sup>22</sup>.

La inmunidad celular respiratoria es mejor estimulada por bacterias vivas en el tracto respiratorio. Las defensas pulmonares tanto nativas normales como adquiridas pueden ser abatidas por restos bacterianos inusualmente altos<sup>6</sup>.

Cabe mencionar que los lechones lactantes no son infectados por la transferencia de anticuerpos en el calostro de su madre, (inmunidad pasiva), la cual perdura hasta la 6<sup>ta</sup> - 8<sup>va</sup> semana de edad<sup>9,31</sup>. *Actinobacillus pleuropneumoniae* se encuentra en las tonsilas de las crías, en unos niveles muy bajos, y es hasta el destete (4 - 12 semanas) que la enfermedad se presenta con toda la historia clínica conocida al igual que los signos y síntomas clínicos<sup>9</sup>.

Son susceptibles los cerdos de cualquier edad, sin embargo, se presenta con mayor frecuencia en animales de más de tres meses de edad y hasta el peso faena<sup>7</sup>. Los cerdos portadores, clínicamente sanos, representan la fuente más importante de infección, siendo en tonsilas el lugar de colonización<sup>13, 33</sup>.

Por lo general, existe una mayor incidencia del problema después de la movilización de los animales a los corrales de crecimiento o de engorda, por lo que el factor stress juega un rol importante en cerdos infectados subclínicamente<sup>30</sup>.

La mortalidad en las engordas se eleva hasta 60% cuando se introduce el agente etiológico (*Actinobacillus pleuropneumoniae*). Esto no quiere decir que este agente no cause enfermedad en otros cerdos como los de pie de cría o del destete, sin embargo los problemas clínicos son todavía mas graves en la engorda, estos aspectos han cambiado a través de los años<sup>24</sup>

La virulencia de *A. pleuropneumoniae* es multifactorial, integrada por la suma de distintos factores estructurales y secretados; entre los primeros se incluyen componentes de la membrana externa, como el LPS, la cápsula, las fimbrias o las PME, mientras en los segundos se incluyen las toxinas<sup>9876</sup>.

## 1.2 Agente Etiológico.

La bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* es el agente responsable de la PCP y esta ampliamente distribuida en muchos países: El agente etiológico es considerado hoy en día como *Actinobacillus pleuropneumoniae* debido a los estudios realizados sobre las bases fenotípicas y sobre el ácido desoxirribunucleico (ADN) de estas bacterias, hicieron se transfiriera de la especie *Haemophilus pleuropneumoniae* a la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 1 es dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y la especie *Pasteurella haemolytica* like a la especie *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2 si no depende de NAD<sup>1</sup>.

La enfermedad fue reportada por primera vez por Pattison en 1957 en Estados Unidos, del que siguieron reportes de Gran Bretaña y Argentina, a partir de está fecha, tanto el microorganismo como la enfermedad se ha identificado en todo el mundo .En 1983 Pohl y col. Realizaron experimentos de hibridación de DNA con *Haemophilus pleuropneumoniae* y *Haemophilus influenzae* encontrando que el porcentaje de hibridación de DNA entre los genomas no mantenía ninguna relación. Sin embargo, basada en experimentos de hibridación de DNA y características fenotípicas, *Haemophilus pleuropneumoniae* se mantuvo relacionado con *Actinobacillus lignieresii*. Más tarde, Pohl y col; propusieron a *Haemophilus pleuropneumoniae* dentro del genero *Actinobacillus* especie *pleuropneumoniae* con dos biovariedades: Una biovariedad 1 factor V (NAD) dependiente y una biovariedad 2 factor V independiente<sup>1,18,26</sup>

La bacteria es Gram negativa y pleomórfica, generalmente se observa como un bacilo corto, encapsulado, mide de 0.5 a 1.5 um de largo por 0.3um de ancho. Es una bacteria carecente de flagelos y no produce esporas, sin embargo, posee fimbrias citoadherentes<sup>18, 27</sup>.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* es aerobio o anaerobio, una característica fundamental de este microorganismo es la dependencia de NAD, factor de crecimiento conocido como V, el cual tiene la siguiente formula:  $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$ : no requieren de hemina, conocido como factor de crecimiento X presente en los medios enriquecidos con sangre<sup>18,21</sup>.

Para los aislamientos primarios es importante que el NAD se lo proporcione in situ otro microorganismo, mediante una estría sobre el cultivo sospechoso de

*Actinobacillus pleuropneumoniae*, dicho fenómeno se conoce como satelitismo. Entre los microorganismos utilizados como cepas nodrizas se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*; *Streptococcus faecalis* especies del genero *Bacillus* y especies del género *Pseudomonas*<sup>16</sup>.

El empleo de *Staphylococcus aureus* nos permite observar además de la dependencia, el fenómeno de Christie; Atkins y Munich - Petersen (CAMP), en donde la beta hemólisis de la toxina -  $\beta$  del estafilococo actúa en forma sinérgica con la cohemolisina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* sobre placas de agar sangre<sup>2</sup>. Las colonias en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) con la cepa nodriza, suelen ser muy pequeñas (menores a un milímetro), blanquecinas, brillantes y mucoides<sup>2</sup>.

La mayoría de las cepas de *A. pleuropneumoniae* se caracterizan por su dependencia del factor V (nicotinamida adenina dinucleótido, NAD) constituyendo el biotipo I, que es el principal; no obstante se han descrito también otras capaces de crecer en su ausencia constituyendo el biotipo II, de menor interés práctico, aunque estas cuestiones han sido revisadas recientemente y en la actualidad todas las cepas se integran en un biotipo único<sup>1, 2, 18</sup>.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* crece bien a 37° C, preferiblemente en presencia de CO<sub>2</sub> (5%), al menos en los cultivos iniciales. En 24 horas o menos (en los subcultivos) produce colonias redondas, pequeñas (1 mm de diámetro o menos), lisas y brillantes o mates y de aspecto céreo, de color gris blanquecino y olor característico<sup>16</sup>.

No se consideran microorganismos muy exigentes y crecen bien en distintos tipos de medios de cultivo (suplementados con NAD) aunque los medios ricos en glucosa, minerales y vitaminas, producen mejores crecimientos y estos son más rápidos. Habitualmente se utiliza agar chocolate suplementado con  $\beta$ -NAD (0.025-0.07%). Alternativamente se utilizan agar PPLO suplementado y agar sangre (5% de sangre), inoculando una estría nodriza de *Staphylococcus aureus* o *S. intermedius*, que producen NAD y permiten un crecimiento satélite o también conocido como efecto satelitismo<sup>27</sup>.

Todas las cepas son hemolíticas en agar sangre, casi todas las cepas son de la biovariedad que requieren NAD, pocas cepas son de la biovariedad 2 no

dependientes de NAD estas se conocían previamente como organismos tipo *Pasteurella haemolytica*. Doce serotipos capsulares han sido descritos, independientemente del método de serotipificación puede ocurrir reacción cruzada entre serotipos<sup>6</sup>. El serotipo 8 puede cruzar con los serotipos 3 y 6, el serotipo 9 con el 1, el 7 con el 4 y 5.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* posee numerosas enzimas que le permiten un metabolismo muy activo. Produce ácido de la glucosa (sin gas) y también (con gas) del manitol, xilosa, ribosa y, algunas cepas, incluso de la lactosa. Además poseen una potente ureasa,  $\alpha$  y  $\beta$  galactosidasa, fosfatasa alcalina, reducen los nitratos a nitritos y producen H<sub>2</sub>S. Desde el punto de vista de la diferenciación con otras especies, reviste especial importancia su capacidad hemolítica y el que produzcan reacción CAMP con exosustancias ( $\beta$ -toxina) de *S. aureus*<sup>27</sup>.

### 1.3 Epidemiología de la PCP

Por lo general afecta a cerdos entre 8-18 semanas de vida. Tanto la morbilidad como la mortalidad pueden ser exacerbadas por la asociación con la enfermedad de Aujeszky y PRRS<sup>9, 23, 17</sup>.

Se considera, por regla general, que la incidencia de la pleuroneumonía porcina está ligada a variación estacional, siendo normal observar expresiones clínicas en épocas frías del año. No obstante, algunos autores consideran que la incidencia de la enfermedad se mantiene a lo largo de todo el año<sup>1</sup>.

El cerdo es la única especie que en forma natural es susceptible a *Actinobacillus pleuropneumoniae* causándole una PCP sobreaguda, aguda y crónica. La morbilidad se puede presentar hasta en un 100%, con una mortalidad variable que se encuentra a nivel mundial y su incidencia varía de un 5 a 75% en las diferentes explotaciones porcinas, la mortalidad se observa en cerdos de 4 semanas de edad<sup>10, 25</sup>.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* se transmite por contacto directo, por medio de aerosoles de un cerdo portador o enfermo a otro susceptible. Durante los brotes de PCP agudos en la granja, la enfermedad se disemina de zahúrda a zahúrda, que se irradia desde ellas con una severidad e incidencia disminuida, sugiriendo el papel del aerosol en la diseminación de la enfermedad<sup>1, 10, 12, 18, 26</sup>.

La infección se produce por aerosol o por contacto directo entre animal enfermo y sano. En estudios de infección experimental se ha podido demostrar que *A. 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 ApxI, ApxII y ApxIII 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 esta 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<sup>27</sup>.

Los síntomas de esta enfermedad son jadeo y sangrado por la nariz, hasta provocar la muerte del animal. Al practicarse la autopsia, se encuentra que el 90% del pulmón está infartado. Cuando la bacteria invade a su huésped le provoca bronconeumonía, muerte del tejido afectado (necrosis) y pleuritis, inflamación en las membranas que recubren a los pulmones y la cavidad torácica. Los signos clínicos, la historia de la piara y las lesiones macroscópicas son base para el diagnóstico, sin embargo la identificación completa del microorganismo requiere el aislamiento bacteriano<sup>22</sup>.

Las lesiones macroscópicas se localizan principalmente en el aparato respiratorio e incluyen: neumonía bilateral que afecta a los lóbulos apicales, cardíacos y parte del diafragmático donde las lesiones neumónicas están localizadas y bien definidas. Desde el punto de vista anatomopatológico, se definen las lesiones como: neumonía necrótica y fibrinohemorrágica con pleuritis fibrinosa<sup>27</sup>.

Las lesiones microscópicas en las áreas pulmonares afectadas de la forma aguda, se observa una intensa congestión, hemorragia y edema alveolar. En estos territorios los septos interlobulillares aparecen engrosados a causa del edema intersticial, con los vasos linfáticos dilatados, y presencia de células inflamatorias y eritrocitos entre las redes de fibrina<sup>1,18</sup>.

Los alvéolos contienen células inflamatorias, células descamadas y fibrina. Las lesiones características consisten en áreas de necrosis por coagulación asociadas con vasculitis y trombosis. Alrededor de los focos de necrosis destaca una franja celular basófila formada por acúmulos de leucocitos



degenerados de aspecto fusiforme, identificados como macrófagos y neutrófilos, que llenan las luces alveolares<sup>18</sup>

Las lesiones en vías aéreas de conducción se manifiestan en forma de exudados bronquiolares compuestos por células epiteliales, células inflamatorias degeneradas y fibrina. La pleuritis en el periodo agudo es serofibrinosa con linfangiectasias en el parénquima subyacente<sup>27</sup>.

También los cerdos pueden infectarse en forma indirecta, por el mismo personal de la granja por medio de la ropa, botas e instrumental contaminado<sup>24</sup>

*Actinobacillus pleuropneumoniae* posee varios factores de virulencia, que interactúan entre ellos para producir al cerdo la pleuroneumonía, tales como: es específico de especie, probablemente por su epitelio de la mucosa respiratoria, posee receptores para los pilis citoadherentes, fimbrias que solo se expresan en el cerdo. *Actinobacillus pleuropneumoniae* por ejemplo, tiene entre otras características una cápsula que le sirve como escudo de protección contra los anticuerpos celulares que buscan destruirlo; esto le permite infiltrarse en la célula y adherirse en la mucosa respiratoria. En animales infectados crónicamente, el organismo puede quedar secuestrado en lesiones necróticas pulmonares, y puede ser recuperado en tonsilas y de las vías respiratorias altas<sup>22</sup>.

La virulencia atribuible a la cápsula es variable entre los diferentes serotipos. La cápsula de *Actinobacillus pleuropneumoniae* no tiene actividad tóxica o actividad pirógena, pero si hay actividad blastogénica linfocitaria, así mismo hay resistencia a la fagocitosis por parte de los neutrofilos además de que interfiere con la actividad del complemento hacia la membrana. El LPS de los diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, induce una infiltración de células observándose una neumonía intersticial multifocal y no la neumonía fibrinohemorrágica necrótica clásica de la PCP. Una vez garantizada la permanencia de la bacteria en el pulmón, esta excreta sus exotoxinas. La actividad de las citolisinas es probablemente la responsable de las lesiones de la PCP, caracterizada por ser hemorrágicas y necróticas<sup>1,2,18</sup>.

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 una cápsula de tejido conectivo. Estas lesiones contienen un elevado número de microorganismos, lo que determina un estado

de animales portadores crónicos, pudiendo tener lugar una exacerbación de los síntomas y la aparición de complicaciones debidas a la intervención de otros microorganismos oportunistas. En esta fase aparecen exudados purulentos en bronquios y bronquiolos y si no se produce la reabsorción del exudado fibrinoso pleural, éste evoluciona hacia la fibrosis con formación de sinequias. En los ganglios linfáticos regionales se observa linfadenitis purulenta<sup>18,27</sup>.

Una de las complicaciones más frecuentes de la pleuroneumonía porcina es la pericarditis serofibrinosa con desarrollo posterior de adherencias y engrosamiento fibroso. 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<sup>27</sup>.

Generalmente, las prácticas que incrementa el contacto entre cerdos aumenta el reto bacteriano. Esto se debe a que las bacterias del tracto respiratorio son transmitidas principalmente mediante exudados respiratorios y secreciones que se difunden en grandes gotas mediante contacto, tos/ estornudos<sup>15,18,,27,30</sup>.

#### 1.4 Cápsula

*Actinobacillus pleuropneumoniae* se clasifica en serotipos sobre la base del antígeno capsular (K). 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 a 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, 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<sup>21, 26,27</sup>.

Las propiedades biológicas de la cápsula son inertes, no tienen actividad tóxica (como la reacción de Schwartzman), tampoco tiene actividad pirógena. Sin embargo, se ha encontrado mata al embrión de pollo, presenta actividad blastogénica linfocitaria, debido a la carga negativa que le confiere la cápsula hay resistencia a la fagocitosis por neutrofilos (PMN), es opsonizado por los anticuerpos e interfiere con la actividad del complemento hacia la membrana<sup>4</sup>.

El grado de desarrollo de la cápsula varía según los serotipos (mientras en los serotipos 1, 3 y 5 esta bien definida, en el 2 y 7, apenas se identifica). Su papel se deduce del descenso de mortalidad cuando se utilizan anticuerpos anti-cápsula, aunque otros datos son más cuestionables; además posee propiedades antifagocíticas y resulta una barrera muy útil frente a los anticuerpos o frente al poder bactericida natural del suero (activación del complemento por la vía alternativa<sup>1,18</sup>).

Con el microscopio electrónico se han identificado fimbrias a través de las cuales se adhiere a la traquea y al pulmón, por lo que se piensa pueden desempeñar un papel activo en la colonización<sup>27</sup>.

Los anticuerpos generados contra la cápsula, solo protegen contra la muerte, pero no contra las lesiones pulmonares y la infección crónica. La virulencia atribuida a la cápsula es variable entre los diferentes serotipos<sup>9,26</sup>.

### 1.5 Fimbrias citoadherentes.

Se han identificado estructuras de *Actinobacillus pleuropneumoniae* semejantes a fimbrias o pilis citoadherentes, denominados también adhesinas 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 cerdos SPF, en donde se demuestra que *Actinobacillus pleuropneumoniae* presenta factores de adherencia o pilis citoadherentes en el cerdo<sup>1</sup>.

### 1.6 Lipopolisacárido

El LPS posee propiedades semejantes al de otros Gram negativos, asociadas a su carácter de endotoxina; además también permite la adherencia al epitelio de las vías respiratorias, siendo clave en la colonización e incluso también puede representar una alternativa en la captación del hierro, a partir de la hemoglobina. El LPS es importante en la respuesta inflamatoria por la capacidad inductora de citoquinas (TNF- $\beta$ , IL-1, IL-6 y IL-8) que desempeñan una importante función en la patogénesis de la enfermedad respiratoria. En la pleuroneumonía porcina se han descrito niveles altos de IL-6, IL-1 y TNF- $\beta$  en el suero de los animales enfermos y también en células de lavado pulmonar 2-4

horas post-infección. El TNF- $\beta$  aparece tanto en procesos agudos como en crónicos<sup>27</sup>.

El antígeno O (somático) del LPS, inmunodominante, causa reacciones cruzadas que originan problemas en la tipificación, especialmente muy evidentes en el caso de los serotipos 1, 9 y 11; 3, 6 y 8; y 4 y 7. Un serotipo se identifica por sus antígenos K y O<sup>27</sup>.

Otras moléculas de la membrana externa (proteínas de la membrana externa (PME) también son antígenos importantes desde el punto de vista taxonómico. Se incluyen lipoproteínas y otras proteínas que se expresan en presencia de maltosa o ausencia (condiciones limitantes) de hierro libre. Finalmente algunas sustancias solubles secretadas durante el crecimiento y multiplicación microbiana poseen carácter antigénico, entre las que destacan las toxinas RTX<sup>27</sup>.

RTX. Desde el punto de vista taxonómico, un sistema PCR basado en los patrones genéticos de los genes *apx* y *omlA* permite, debido a su variación, dividir los serotipos en 4 grupos diferentes. El primero incluye los serotipos 1, 9, 11 y 12; el segundo los serotipos 2 y 8; el tercero los serotipos 3, 4, 6 y 7 y, finalmente, el cuarto, lo serotipos 5 a, 5 b y 10<sup>27</sup>.

Lipoproteínas; la variabilidad genética del gen *omlA*, codifica para una lipoproteína de la membrana externa, ha permitido, mediante un método PCR, dividir los serotipos de *A. pleuropneumoniae* en 5 grupos distintos. En el grupo I se incluyen los serotipos 1, 9, 11 y 12 (*omlA* I); en el grupo II se integran los serotipos 2 y 8 (*omlA* II); en el grupo III se incluyen los serotipos 3, 6 y 7 (*omlA* III); en el grupo IV (*omlA* IV) el serotipo 4 y en el grupo V (*omlA* V) los serotipos 5 a, 5b y 10<sup>21,27</sup>.

*OmlA* es una lipoproteína de la membrana externa de aproximadamente 40-44 kDa (según los serotipos), con capacidad protectora específica. Los genes que codifican para ella han sido clonados y secuenciados en varios serotipos. *OmlA* y sus variantes alélicas, son distintas antigénicamente, inducen inmunidad protectora frente al serotipo homólogo<sup>27</sup>.

## 1.7 Proteínas de Membrana Externa

El perfil de las proteínas localizadas en la membrana externa, se ha 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 de 39 a 44 Kd (kilo-daltons); de 16 a 16.5Kd y en la región de 29Kd correspondiente a una proteína modificable por el calor, por lo que se han identificado 7 patrones en nueve serotipos probados<sup>18</sup>.

Algunas PME inducen anticuerpos que actúan como opsoninas en la fagocitosis por PMN (neutrófilos) y otras (como los receptores para transferrina), inducen anticuerpos neutralizantes, protectores de la infección. Para resolver el problema de la captación de hierro *A. pleuropneumoniae* ha desarrollado un sofisticado sistema de receptores de superficie que se expresan cuando en el ambiente bacteriano existe escasez de hierro libre y son capaces de obtener este elemento de diversas fuentes complejas, previa transformación en formas solubles. Tales receptores incluyen dos proteínas denominadas TbpA (o Tbp1) y TbpB (o Tbp2), altamente inmunógenas, funcionales con transferrina porcina, sérica o de los espacios intersticiales, pero incapaces de realizar la misma función con compuestos similares procedentes de especies animales distintas. La TbpA es una proteína transmembrana de 106-110 kDa con escasa variabilidad de su secuencia, según los serotipos. La TbpB es, también, otra proteína (lipoproteína) represible por el hierro, pero mucho más variable que TbpA en función de los serotipos (se han descrito 3 tipos), con un tamaño entre 60 y 70 kDa y parece está expuesta en la superficie. Parece que ambas se presentan como un complejo<sup>10,19</sup>.

Los genes de las Tbp están integrados en un operón del complejo TonB que incluye, además del correspondiente (tonB), los denominados exbB y exbD que están unidos transcripcionalmente (por delante) al gen *tbpB* y resultan esenciales para la utilización del hierro de la transferrina, al funcionar como acopladores de energía. TonB parece está implicada en la transducción de energía desde la membrana citoplasmática a los receptores de la membrana externa<sup>18, 22,27</sup>.

OmlA es una lipoproteína de la membrana externa de aproximadamente 40-44 kDa (según los serotipos), con capacidad protectora específica. Los genes que codifican para ella han sido clonados y secuenciados en varios serotipos. OmlA

y sus variantes alélicas, son distintas antigénicamente, inducen inmunidad protectora frente al serotipo homólogo<sup>27</sup>.

## 1.8 Exotoxinas

*Actinobacillus pleuropneumoniae* produce hasta cuatro toxinas RTX distintas, denominadas Apx (Apx-I a Apx-IV), codificadas por un conjunto de cuatro genes *apxACBD* dispuestos en tandem en un operón. El gen estructural (*apxA*) codifica para una proteína inactiva, que se activa por intervención del producto del gen *apxC* y que luego es transportada al exterior por mediación de los productos de expresión de los genes de transporte *apxC* y *apxD*. Las Apx son porinas y forman poros en las membranas celulares, lo que conduce a la lisis de sus células diana. Apx-I, Apx-II y Apx-III son citotóxicas para macrófagos alveolares y neutrófilos, pero solo las dos primeras son hemolíticas. La presencia de una y/u otra, depende de la cepa y el serotipo, de tal modo que algunos serotipos son capaces de producir diferentes combinaciones de dos de ellas, mientras que otros producen solo Apx-I o solo Apx-II. En algunos, se presentan operones truncados que contienen únicamente dos de los 4 genes aunque su función puede mantenerse a partir de los genes disponibles para el otro tipo de toxina. En el cuadro 9 se resume la capacidad tóxica de los distintos serotipos<sup>27</sup>.

Apx-I, II y III producen efecto CAMP y todas son factores de virulencia muy importantes, a las que se atribuye directamente el daño tisular y se implican, con otras causas, en el desarrollo de las lesiones típicas. Aunque las toxinas son capaces de destruir macrófagos y neutrófilos, se admite una cierta capacidad de supervivencia celular (especialmente en los neutrófilos), de los que se evadirían por un mecanismo de "escape" en el que ellas mismas participarían de forma directa. Apx-I, correlaciona fuertemente con la virulencia, de tal modo que los serotipos que la producen se responsabilizan de los brotes más graves y, al contrario<sup>27</sup>.

Mediante la obtención de mutantes deficientes en la producción de Apx-I ó Apx-II ó de ambas, se demostró su participación en la patogénesis, como factores de virulencia.

Recientemente se ha descrito un cuarto tipo de gen RTX, el *apx IV*, del que se han descrito dos variantes presentes, respectivamente, en los serotipos 1 y 3, que ya han sido clonados, secuenciados y expresados en *E. coli*. La Apx IV

recombinante es débilmente hemolítica y produce CAMP con *S. aureus*. Solo se produce *in vivo* y presenta un peso molecular de 202 kDa, con 24 repeticiones ricas en glicina. Se detecta en todos los serotipos y parece ser específica de especie<sup>27</sup>.

La endotoxina es especialmente importante en la enfermedad aguda en donde el choque endotóxico es la causa de la muerte. Tres exotoxinas, parte de la familia RTX de exotoxinas, han sido descritas e incluyen las ApxI, ApxII y ApxIII. Las ApxI y II tienen actividad tanto hemolítica como citotóxica y la ApxIII solo tiene actividad citotóxica. Los serotipos de referencia 1, 5, 9, 10 y 11 producen la ApxI, todos los serotipos excepto el 10 producen ApxII y los serotipos de referencia 2, 3, 4, 6 y 8 producen ApxIII. Estas citotoxinas producen lesiones en pulmón, típicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*<sup>13</sup>.

Se han identificado tres tipos distintos de actividad en las citotoxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Citolisina I (ClyI); Citolisina II (ClyII) y Citolisina III (ClyIII). Se han encontrado cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que son citotóxicas pero no hemolíticas<sup>11</sup>.

La Citolisina I la producen los serotipos 1,5, 9 y 11; así mismo la Citolisina II la producen prácticamente todos los serotipos (1,2,3,4,5,6,7,8,9,11 y 12); mientras que la Citolisina III la producen los serotipos 2,3,4,6, y 8<sup>11,19</sup>.

Estas hemolisinas no muestran diferencias antigénicas entre serotipos, aunque son antigénicamente diferentes entre ellas. La actividad hemolítica de esta proteína es probablemente la responsable de las lesiones iniciales de la PCP, caracterizadas por ser hemorrágicas y necróticas<sup>1</sup>.

En la patogénesis de la pleuroneumonía, el daño tisular es consecuencia directa de microlesiones en las membranas celulares producidas por las toxinas Apx, todas (excepto la Apx IV, cuyo papel todavía no se conoce) producen daño pulmonar y contribuyen a la invasión, por sus propiedades antifagocíticas. Las toxinas afectan, también, a los linfocitos T, lo que altera la respuesta inmune y favorece la cronicidad del proceso. Como todas las cepas producen, al menos, una Apx, la enfermedad es indiferenciable desde el punto de vista clínico, con la salvedad de una mayor o menor gravedad en función del serotipo implicado<sup>27</sup>.

*Actinobacillus pleuropneumoniae* produce una potente ureasa cuya participación en la patogénesis parece que tiene lugar a largo plazo mediante la intervención sobre la respuesta inmune local, lo que permitiría mejorar la persistencia. Las SOD (superóxidodismutasas) son metaloenzimas implicadas en la defensa celular frente al daño oxidativo e incluyen 3 tipos dependientes de sus cofactores: de Mn, de Fe y de Cu/Zn (Mn-SOD, Fe-SOD y Cu/Zn-SOD). En *A. pleuropneumoniae*, el gen *sodC*, codifica una Cu/Zn-SOD ya identificada, clonada y secuenciada. Se localiza en el periplasma del microorganismo y facilita la supervivencia bacteriana local dismutando el superóxido generado por las células inflamatorias. Finalmente se han descrito también proteasas que degradan la hemoglobina y la IgA, *in vitro*; por ejemplo, una de estas sustancias ha sido caracterizada como una metaloproteasa de Zn, aunque su papel en la patogénesis de la enfermedad todavía no se conoce<sup>12,18</sup>.

### 1.9 Pleurotoxina

Se ha encontrado efecto tóxico en células adherentes de lavados pulmonares (macrófagos), así como en monocitos circulatorios, pero su efecto es menor sobre células testiculares. Su producción se inhibe por el oxígeno y el colesterol, es termolábil, hemolítica y tóxica para los neutrofilos (PMN), sensible a las proteasas, es una proteína inmunogénica que es neutralizada por los sueros de cerdos convalecientes a PCP<sup>1</sup>.

### 1.10 Mecanismos de Resistencia Pulmonar

Las defensas pulmonares nativas incluyen a todos los mecanismos innatos que no requieren de una exposición previa a un patógeno pulmonar o vacuna. Las defensas pulmonares nativas normalmente son altamente eficientes y eliminarán a las bacterias inhaladas del pulmón en un lapso de 30 minutos<sup>6</sup>. Las bacterias inhaladas son primeramente confrontadas por el aparato mucociliar en la superficie mucosa de las vías aéreas. Las cuales están revestidas por epitelio ciliar cubierto por una capa de moco. La baja velocidad del aire y los reflujos de corrientes en los puntos de ramificaciones de las vías aéreas provocan que la gran mayoría de las bacterias se impacten en esta capa mucosa. Estas bacterias son enviadas hacia arriba de las vías aéreas por el movimiento ciliar impactándose en la capa mucosa y finalmente son tragadas. Cualquier bacteria que no sea atrapada en la mucosa de las vías aéreas y entre a los alvéolos, es presa de las células fagocíticas alveolares que las engloban y las



matan. Los macrófagos alveolares son las principales células fagocíticas residentes en pulmones y se encuentran en el lumen alveolar. Después de ingerir a las bacterias salen de los alvéolos ya sea vía el aparato mucociliar o migrando a través de las paredes alveolares hacia los vasos linfáticos en donde presentan el antígeno a los linfocitos y estimulan una respuesta inmune. Pocos neutrofilos residen en las vías aéreas o en los alvéolos. Sin embargo, minutos después del daño epitelial de las vías aéreas o de que presentan cualquier otro evento proinflamatorio, inicia la migración de neutrofilos desde las grandes reservas marginales ubicadas en la vasculatura pulmonar. También, como parte de una respuesta inflamatoria, el grupo complementario de proteínas del plasma arriban para aumentar la permeabilidad. Después de la activación enzimática, las proteínas del complemento pueden recubrir a las células bacterianas y propiciar la fagocitosis mediante la opsonización<sup>18</sup>

Las defensas adquiridas de los pulmones están compuestas por la inmunidad dependiente de anticuerpos e inmunidad celular. Las membranas mucosas de los árboles bronquiales están cubiertas por IgA predominantemente producida y secretada localmente. Estas IgA secretadas neutralizan a los virus respiratorios, aglutinan a las bacterias y neutralizan las exotoxinas bacterianas, pero no activan el complemento y contribuyen muy poco a la opsonización por parte de los fagocitos. La producción de IgA secretoria específica es estimulada principalmente por agentes microbianos vivos en contacto con la mucosa respiratoria. Las IgG son los anticuerpos predominantes en los alvéolos y son principalmente un trasudado del suero. En los pulmones sanos existen pocas IgG en alvéolos; sin embargo, grandes cantidades arriban en la fase temprana de inflamación como consecuencia de un incremento en la permeabilidad vascular. Las IgG son específicamente dirigidas contra las bacterias en alvéolos, facilita la fagocitosis por medio de opsonización, neutraliza las toxinas bacterianas inhibe el crecimiento microbiano y la adherencia, activan el complemento y reclutan a las células inflamatorias<sup>6</sup>. Los antígenos bacterianos solubles y particulados son tomados rápidamente de los pulmones y estimulan la producción local y sistémica de IgG. La respuesta inmune celular respiratoria es mediada por linfocitos T sensibilizados. Estos linfocitos T sensibilizados secretan linfocinas que reclutan linfocitos y macrófagos adicionales y promueven el aniquilamiento microbiano por medio de los macrófagos. La inmunidad celular respiratoria es mejor estimulada por bacterias en el tracto respiratorio. Las defensas

pulmonares tanto nativas normales como adquiridas pueden ser abatidas por retos bacterianos inusualmente altos<sup>6</sup>.

El pulmón y el útero son los únicos órganos que pese a su comunicación con el ambiente, son en condiciones normales, microbiológicamente estériles. Este aspecto es especialmente notable en el caso del pulmón, para sostener esta situación intervienen diversos mecanismos y su falla forma parte de las situaciones patogénicas que conducen al establecimiento de los cuadros neumónicos. Su comprensión también permite establecer las fuertes relaciones existentes entre las condiciones ambientales de cría y la presentación de las neumonías<sup>18</sup>

Es importante decir que en gran medida los problemas respiratorios, obedecen a defectos de instalaciones y del manejo de la piara en las mismas. Por lo anterior, el seguimiento de los animales al rastro y la evaluación de la condición pulmonar, permitirá muchas veces tomar medidas de control que se adelanten a la presentación de cuadros clínicos graves<sup>1</sup>.

Mezclar cerdos de diferentes orígenes siempre ha sido una receta para obtener problemas. Intuitivamente esto es correcto pues cerdos de diferentes orígenes obviamente tienen diferentes estados de salud y el introducir un patógeno virulento a una población de animales sin inmunidad tiene consecuencias serias. De la misma manera, los sistemas de flujo continuo comparados con los de todo dentro/todo fuera, son poco deseables debido al impacto negativo en el desarrollo de los cerdos. Esto se debe a que en el sistema de flujo continuo se acumulan patógenos en el medio ambiente que evitan el control de las enfermedades. Entonces, lo ideal sería retener cerdos de una sola fuente y utilizar el sistema todo dentro/todo fuera<sup>25</sup>. Los primeros trabajos realizados sobre SEW (Destete temprano segregado) sugirieron que se podían mezclar cerdos de diferentes fuentes con buenos resultados. Una de las explicaciones propuestas era que al mezclar cerdos jóvenes, mientras todavía tenían protección de la inmunidad calostrual, estarían protegidos contra diferentes agentes infecciosos. Además, ya que estos cerdos jóvenes son menos propensos a ser portadores de agentes infecciosos, habría un menor reto y riesgo<sup>11</sup>.

Cuando un cuadro neumónico se caracteriza mayoritariamente en sus lesiones por la proliferación o espesamiento de estructuras propias del pulmón, tejido

linfoide, macrófagos alveolares, epitelio bronquiolar, septos alveolares, la neumonía se considera proliferativa; por lo contrario, cuando en el cuadro de lesión predominan elementos exudados de la sangre al tejido pulmonar se considera una neumonía exudativa, aunque la pleuroneumonía contagiosa no se ajusta a esta clasificación ni a ninguna otra<sup>1</sup>.

La neumonía bacteriana en cerdos es mucho menos común que la infección subclínica del tracto respiratorio superior con bacterias potencialmente patógenas. La mayoría de las especies bacterianas que causan neumonía son comensales de la mucosa nasofaríngea o de las tonsilas palatinas. Casi todos los cerdos son portadores nasales o tonsilares de varias bacterias patógenas pulmonares. Aunque estos organismos son inhalados constantemente, usualmente son eliminados rápidamente por el pulmón por un gran número de mecanismos pulmonares de defensa, tanto propios como impropios. Para que la neumonía se desarrolle debe ser retenida en los pulmones y proliferar. Para que esto ocurra, las defensas pulmonares en las vías aéreas deben de estar comprometidas, abatidas por altos niveles de reto bacteriano o ingresar por una ruta alternativa<sup>21</sup>.

Los patógenos respiratorios bacterianos pueden ser agrupados en tres grandes categorías basadas en la relativa virulencia y/o la ruta de infección: inhaladas, de inhalación secundaria o transportada por sangre. Los patógenos bacterianos de inhalación primaria infectan los pulmones por las vías respiratorias y causan neumonía al ser inoculados intratraquealmente a cerdos susceptibles. Los patógenos bacterianos de inhalación secundaria no producen neumonía cuando son inoculados intratraquealmente en cerdos. Los patógenos pulmonares transportados por sangre son aquellos que llegan al pulmón como consecuencia de una bacteremia o septicemia<sup>18</sup>.

### 1.11 Mecanismos inespecíficos

La disposición anatómica de los cornetes en las fosas nasales, unido a las características de la mucosa nasal, asegura que el aire inspirado se acelere al paso por los mismos y se generen turbulencias que impactan las partículas suspendidas de mayor tamaño (20 - 520 micras o más) en el moco que cubre la superficie de la mucosa nasal. La gran vascularización de esta mucosa asegura además un primer calentamiento del aire inspirado, amortiguando los cambios

de temperatura del ambiente. Pese a lo anterior los mecanismos nasales no son imprescindibles al proceso<sup>1</sup>.

Es probable que la disposición anatómica del árbol traqueo - bronquiolar, complemente o en su caso supla, la retención de partículas por impactación en la superficie de la mucosa y su remoción por actividad ciliar. Las sucesivas ramificaciones del sistema generan turbulencias al mismo tiempo que por el incremento del diámetro se reduce la velocidad del aire inspirado, facilitando el atrapamiento por impactación de partículas suspendidas de entre 20 y 10 micrones, en tráquea y bronquios, mientras las partículas de 10 a 2 micrones son retenidas en bronquios menores. Las partículas de 2 a 0.5 micrones tienen oportunidad de llegar a las partes finales de las vías respiratorias, bronquiolos terminales, respiratorios y alvéolos y son en consecuencia las más peligrosas en el establecimiento de problemas neumónicos. Las partículas de menos de 0.5 micrones se mantienen suspendidas y son expelidas<sup>1,18</sup>.

Es probable que la disposición anatómica del árbol respiratorio explique que las neumonías aerógenas se localicen, en las especies domésticas en las porciones antero-ventrales del pulmón, lóbulos apicales y cardíacos fundamentalmente. A esta particular distribución también puede colaborar, la menor distribución capilar en estos lóbulos, así como la menor amplitud de los movimientos respiratorios en la porción anterior de la caja torácica<sup>1,18</sup>.

Las condiciones ambientales de humedad son determinantes de las características de tamaño y suspensión, de las partículas de aerosoles que expelen los animales al toser o estornudar, condicionando así la transmisión de los patógenos entre animales sanos y enfermos y que estos, suspendidos en los aerosoles, alcancen las partes profundas del pulmón donde pueden establecerse y producir las neumonías primarias. En contra parte la humedad también es crítica en definir la fluidez del moco y facilitar su remoción por el movimiento ciliar, en ambientes secos el moco es menos fluido y es removido con dificultad por los cilios<sup>1</sup>.

La actividad mucosa respiratoria, revestida por un epitelio pseudoestratificado ciliado, son células calciformes productoras de moco, se extienden por tráquea, bronquios y bronquiolos, para desaparecer a nivel de los bronquiolos terminales y respiratorios, donde es sustituido por epitelio cúbico simple, no ciliado y sin células calciformes, condiciones que hacen de este sector de las

vías respiratorias la porción mas sensible al establecimiento de los patógenos primarios (virus y micoplasmas) inspirados en los aerosoles e inductores de los cuadros neumónicos. Al aparato mucociliar se agrega la secreción de pequeñas glándulas mucosas, tubulares, localizadas en la mucosa de tráquea y bronquios. El moco contiene además sustancias bactericidas o bacteriostáticas (lisozima, beta lisina) que contribuyen a eliminar los microorganismos aglutinados en el<sup>18</sup>.

Las bajas temperaturas, sobre todo cuando ocurren en pocas horas con amplios rangos (mas de 10°C), inducen la reducción y hasta la anulación momentánea del movimiento ciliar, situación aprovechada por los patógenos primarios para establecerse en pulmón<sup>1</sup>.

A nivel alveolar el principal mecanismo de resistencia pulmonar es la fagocitosis inmune o no. Los macrófagos alveolares o neumocitos III (MsAI), son como los del resto del sistema de origen medular y llegan al pulmón como monocitos sanguíneos, sin embargo, sus cualidades funcionales son fuertemente diferentes, como consecuencia de la adaptación a elevadas presiones de CO<sub>2</sub>. La fagocitosis alveolar se ve favorecida por el surfactante pulmonar, producidos por los neumocitos II y por los mecanismos inmunes aglutinantes (IgA) u opsonizantes (IgG). Completada la fagocitosis los MsAI salen del pulmón por vía linfática a los ganglios mediastínicos y bronquicos<sup>18</sup>.

La inmunidad celular respiratoria es mejor estimulada por bacterias vivas en el tracto respiratorio. Las defensas pulmonares tanto nativas normales como adquiridas pueden ser abatidas por restos bacterianos inusualmente altos<sup>6,11</sup>.

### 1.12 Distribución Geográfica

Desde sus reportes iniciales en 1957 en Estados Unidos por Pattison y en Argentina por Shope, esta enfermedad ha sido diagnosticada en un total de veintidos países presumiéndose sea problema de distribución mundial, ocasiona perdidas anuales millonarias, debido no solo a la alta mortalidad generada por la infección aguda, si no también por la notable disminución en la tasa de conversión de alimento, perdida de ganancia de peso y retraso del momento en que los cerdos deben ir al matadero cuando la infección es crónica<sup>30</sup>.

Los serotipos más comunes en los Estados Unidos son el 1,5 y 7, en Canadá son los 1, 2, 3, 5, y 7, en Europa son los 1, 2, 5, 7, y 9. La virulencia difiere

marcadamente entre serotipos y cepas. Generalmente los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11 son los más virulentos<sup>6</sup>.

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP) esta ampliamente distribuida en muchos países. En Dinamarca se han encontrado casi todos los serotipos (1,2,3,4,6,8,9,10,11 y 12), prevaleciendo el serotipo 2; en algunos otros países como: Argentina, Irlanda, Rumania; Taiwán y Venezuela han identificado sólo un serotipo (1,8,5,5y 7 respectivamente) los serotipos 13,14, 15 no se han encontrado en América del norte<sup>6,27</sup>.

En Francia se encuentran las cepas de los serotipos 2, diferentes a las del continente Americano, son muy virulentas, y producen perdidas significativas<sup>23,24</sup>

### 1.13 Diagnóstico

El diagnóstico debe ser oportuno y rápido para la PCP y es esencial identificar los diferentes serotipos prevalentes en el país, para elaborar los biológicos adecuados para el diagnóstico y la inmunización de los animales, así mismo se requiere de la información aportada por la sintomatología, anatomopatología y bacteriología sobre la base de la caracterización morfológica y de cultivo; caracterización bioquímica<sup>30</sup>.

El método serológico es el más adecuado ya que se puede realizar en los animales vivos con o sin signos clínicos, no requiere del sacrificio de los cerdos, es más rápido y nos permite hacer perfiles de la enfermedad, identificando el punto de infección en la granja.<sup>18</sup>

El diagnóstico en casos agudos y sobre agudos se logra al demostrar las lesiones características macro y microscópicas y mediante el aislamiento bacteriano de *Actinobacillus pleuropneumoniae* Cuando el tratamiento por antibióticos interfiere en el aislamiento, las pruebas de ELISA y PCR son de gran efectividad<sup>14,15</sup>, también la aglutinación ha sido efectiva para la detección de antígeno bacteriano no viable. En casos crónicos, bacterias viables o antígeno bacteriano pueden ser más difíciles de demostrar.

El diagnóstico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* normalmente se hace por presentación de las lesiones típicas en pulmón en la examinación postmortem,

en combinación con el aislamiento y serotipificación de la bacteria en el laboratorio. Se tiene que hacer un diagnóstico diferencial para no confundirse con fiebre porcina clásica, pasterelosis pleurítica, erisipela e infecciones por estreptococos en los casos hiperagudos y agudos. Es poco frecuente que se encuentren infecciones combinadas en presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* Se puede utilizar la prueba de ELISA, para diagnosticar el serotipo y así detectar portadores subclínicos<sup>18</sup>

Fijación del complemento. Originalmente fue concebida como un método de detección de especie transformándose después en una prueba de detección específica del serotipo. Los antígenos se preparan por sonicación de una suspensión de bacterias, recogiendo el sobrenadante. Además, se requiere la presencia de complemento, suero bovino fetal, y el suero problema. La fijación del complemento es más específica que la hemaglutinación indirecta, porque es capaz de distinguir entre *A. pleuropneumoniae* y *H. parasuis* pero su validez para el serotipificado es cuestionada ya que la frecuencia de falsos negativos es alta. La realización de esta prueba es, por otro lado, un proceso laborioso y complejo, que requiere un elevado grado de estandarización para su éxito y con inconvenientes técnicos que lo complican<sup>18,31</sup>.

La fijación del complemento fue adaptada a la pleuroneumonía en 1971. Los antígenos más utilizados vienen representados por un extracto capsular (a 56°C durante 30 minutos) o por la fase acuosa de una extracción fenol-agua. Ha sido sustituida progresivamente por el ELISA, en razón de los importantes inconvenientes relacionados con algunas características de los sueros porcinos que precisan su calentamiento a 56°C durante 30 minutos para destruir el complemento propio, lo que provoca la destrucción de un factor imprescindible que hace necesario el aporte de suero sin calentar de otra especie como fuente externa del factor inactivado, además de que algunos sueros presentan actividad anticomplementaria, lo que obliga a la incorporación de controles adecuados y a la presencia de un porcentaje elevado de reacciones falsas negativas<sup>27</sup>.

La prueba de fijación del complemento se utiliza en muchos países en forma rutinaria porque determina que granjas están libres de la enfermedad, sin embargo, es una prueba demasiado complicada que ocupa muchos controles, además de que el suero no debe estar hemolisado y por lo tanto el sangrado del cerdo deberá de ser el adecuado<sup>27</sup>.

El uso del ELISA en el serotipado de *A. pleuropneumoniae* se propuso inicialmente 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 no ha sido posible conseguir hasta la fecha. Primero se adaptaron los protocolos con el serotipo 5, que no presentó dificultades (tanto los polisacáridos capsulares, como el LPS y las proteínas de la membrana externa resultaron ser antígenos específicos de ese serotipo) pero cuando se abordó el serotipo 1, los resultados no fueron tan alentadores, pues los antisueros frente a este serotipo reaccionaron cruzadamente con los de los serotipos 9 y 11 (mediante la producción de anticuerpos monoclonales se ha señalado la presencia de epítomos comunes en el LPS); igualmente se han demostrado repetidamente las reacciones cruzadas entre los serotipos 4, 7 y *A. lignieresii*<sup>27</sup>.

El uso de las pruebas serológicas es fundamental para la identificación de portadores asintomático, responsables de la diseminación de la enfermedad en piaras no infectadas<sup>7,8</sup>. Las técnicas inmunológicas directas como inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (IHQ) representan otra opción para el diagnóstico de la PCP. Estas técnicas tienen como base la identificación de antígenos, serotipo y biotipo específicos en tejidos frescos, congelados o fijados en formol e incluidos en bloques de parafina<sup>14,15,22,29</sup>.

Hemaglutinación indirecta. También se utiliza para la detección de Ac en el suero y representa la técnica preferida por la mayoría, por su sensibilidad y especificidad, aunque no discrimina de *H. parasuis*. El método consiste en sensibilizar glóbulos rojos de oveja con un extracto salino de *A. pleuropneumoniae* (serotipo) tapizando después placas de microtitulación a las que se añaden diluciones seriadas del suero anti correspondiente<sup>27</sup>.

Ya que se establece *Actinobacillus pleuropneumoniae* en la granja es difícil su eliminación, teniéndose que tomar medidas bastante agresivas. La eliminación de portadores y de cerdos en fase crónica sería un primer paso a la dirección correcta.

#### 1.14 Métodos de Diagnóstico de la PCP

La consideración de aspectos epidemiológicos sumada a los hallazgos patológicos, en la mayoría de los casos macroscópicos, permite alcanzar un



diagnóstico presuntivo de razonable seguridad. Razón por la cual veterinarios responsables de las granjas porcinas, deben habituarse a realizar sistemáticamente la necropsia de los animales muertos y a reconocer con cierta precisión las alteraciones presentes, pues la sola observación de las lesiones macroscópicas les asegurará un diagnóstico razonablemente confiable y el tomar medidas correctivas adecuadas a la situación establecida.

Los signos clínicos, la historia de la pira y las lesiones macroscópicas son base para el diagnóstico; sin embargo, la identificación completa del microorganismo requiere el aislamiento bacteriano y serotipificación.<sup>22</sup>

Los métodos de diagnóstico de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP) los podemos clasificar en los siguientes: 1) Observación de los signos clínicos en el cerdo y en los de la zahúrda. Este método no es confiable ya que solo los signos clínicos se presentan en cursos agudos de la enfermedad mientras que de casos crónicos pasa inadvertidos. 2) Observaciones de la necropsia de los animales muertos de casos agudos o durante la inspección en los centros de abasto de los casos crónicos. 3) Aislamiento y tipificación del *Actinobacillus pleuropneumoniae* de los pulmones de cerdos con problemas agudos o bien crónicos. El aislamiento y tipificación del microorganismo tarda de 48 a 72 horas, contando con personal calificado. 4) Diagnóstico serológico, no requiere del sacrificio de los cerdos y es más rápido<sup>12</sup>.

En México se emplea una tecnología sencilla y de bajo costo, se trata de un kit, que permite conocer la situación de la granja con respecto a la enfermedad y poder así establecer las medidas de control necesarias. El kit de diagnóstico serológico de la PCP fue denominado PLEUROTTEST, hoy en día se conoce como NEUMOTEST<sup>18</sup>

La serotipificación es el método comúnmente utilizado y se basa en la determinación del tipo de antígenos capsulares presentes en cada aislamiento, que permite su agrupación en serotipos, utilizando para ello anticuerpos específicos policlonales o monoclonales. Los inconvenientes del serotipado tradicional incluyen la presencia de reacciones cruzadas y de cepas no tipables. Se han descrito un sinnúmero de reacciones cruzadas, que dificultan una buena conclusión del serotipo, aunque son especialmente importantes las debidas al carácter inmunodominante del LPS y que hacen reaccionar a los serotipos 1, 9 y 11, el 4 con el 7 y, finalmente, el 3, 6 y 8; otras reacciones se deben a la

contaminación del reactivo diagnóstico con antígenos de origen citoplasmático, debido a una manipulación o procesamiento inadecuados. Como norma general, cuanto más intenso sea el tratamiento bacteriano, mayor es la inespecificidad de los antígenos recogidos (los antígenos específicos son los más superficiales y se desprenden con tratamientos ligeros)<sup>27</sup>

En lo que se refiere a los antisueros, tradicionalmente se han utilizado los obtenidos en conejos y con menor frecuencia de cerdos. Aún en el mejor de los casos, siempre es habitual la presencia de una cierta cantidad de anticuerpos inespecíficos, que complican la tipificación y que pueden llegar a ser causa importante de errores en el diagnóstico, lo que se puede resolver, al menos en parte, mediante la adsorción repetida de los sueros con suspensiones bacterianas de los serotipos restantes, así como con otras bacterias de especies y géneros relacionados. Las tendencias actuales, sin embargo, apuntan a la sustitución progresiva de estos sistemas por anticuerpos monoclonales, mucho más específicos y uniformes, con mayor afinidad por el determinante antigénico reconocido y un rendimiento ilimitado<sup>21</sup>

Respecto de la técnica utilizada en la tipificación, hay que dejar constancia de la elevadísima cantidad de métodos utilizados, lo que indica la inexistencia de un sistema óptimo, sin inconvenientes, principalmente reacciones cruzadas<sup>21</sup>.

### 1.15 Tratamiento

Existen biológicos en el mercado para el control de la *Actinobacillus pleuropneumoniae* con eficacia variable entre granjas. Una de las debilidades de la vacunación, es que a pesar que disminuye la presentación de signos clínicos de la enfermedad y la mortalidad; no evita la infección ni la transmisión del agente y así perpetuar la enfermedad. Otra de las debilidades de las vacunas es que no cuenta con los factores de virulencia de la bacteria existente en la explotación. Tres endotoxinas están presentes en diferentes cantidades en los diferentes serotipos, al igual que los antígenos de membrana. No hay un factor de virulencia principal común para todos los serotipos por lo que es difícil tener un biológico comercial que tenga todos estos antígenos.

La despoblación-repoblación con animales sero-negativos a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, es un caso extremo pero efectivo, que debe ser acompañado con una buena desinfección de las instalaciones para eliminar la enfermedad.

En las granjas donde la incidencia es baja, la prueba de positivo y remoción del animal daría buenos resultados. En estos casos donde la despoblación es selectiva y la repoblación se lleva a cabo, la vacunación en los animales retenidos no es conveniente; ya que se crea un estado potencial de portadores.

Como tratamiento, EXCENEL™ RTU Suspensión Estéril (clorhidrato de ceftiofur) es una excelente elección antibiótica. Posee un amplio espectro que no solo elimina al *Actinobacillus pleuropneumoniae*, también es altamente efectivo contra otras bacterias patógenas que afectan el tracto respiratorio de los cerdos. En investigaciones In vitro EXCENEL RTU reporta, una efectividad del 97.6% de todas las de *A. pleuropneumoniae* y arriba de un 99.6% de bacterias presentes en el tracto respiratorio.

EXCENEL RTU viene listo para usarse en frascos de 100 ml con 5 gramos de producto activo. Una aplicación de EXCENEL RTU alcanza niveles terapéuticos dentro de los siguientes 12 minutos y se mantienen aún por 24 hrs. después, EXCENEL RTU alcanza 1500 veces los niveles terapéuticos además EXCENEL RTU no requiere de periodo de retiro antes de rastro<sup>21</sup>.

La erradicación de *A. pleuropneumoniae* de hatos seropositivos se ha llevado a cabo llevando un programa combinado de, destete temprano segregado y una terapia agresiva con ceftiofur en lechones<sup>21</sup>.

Pocas enfermedades progresan tan rápidamente como la PCP, la muerte puede presentarse dentro de las primeras cuatro horas desde que aparecen los signos clínicos. El rápido curso de la enfermedad requiere, por tanto, de un diagnóstico preciso y la iniciación de un tratamiento antibiótico inmediato. Para control de la PCP se han utilizado una variedad de antibióticos, entre los cuales están las penicilinas, tetraciclinas, sulfonamidas, eritromicina, estreptomina, y los de nueva gama como la tiamulina, spectomicina, ceftiofur sódico (cefalosporina semisintética derivado del hongo *Cephalosporium acremonium* de amplio espectro antibacteriano)<sup>25</sup>, cefotaxima, y a ultimas fechas la kitasamicina con muy buenos resultados, así como las quinolonas de primera generación, ácido nalidixico y ácido oxolinico; fluoroquinolonas de primera generación como ciprofloxacina, entre otras<sup>21</sup>.

La identificación subclínica de la infección es esencial para el control de la enfermedad<sup>5</sup>. La adición de los antibióticos al alimento es de poco valor en un brote de pleuroneumonía ya que los animales están anoréxicos, además de que

es difícil dar una dosis terapéutica que contenga la mínima concentración inhibitoria (MIC) que el microorganismo requiere para ser eliminado, por lo que el tratamiento por esta vía no previene la infección, solo se puede reducir la severidad de la enfermedad clónica o el número de microorganismo por cerdo infectado<sup>18</sup>

Los tratamientos parenterales han demostrado ser la mejor opción en estos brotes de la enfermedad, sin embargo el costo de los mismos es alto. Cuando se presenta un brote de PCP el productor solo tiene dos opciones: i) vivir con la enfermedad, minimizando el impacto económico en el desarrollo del hato o 2) tener un hato libre de *Actinobacillus pleuropneumoniae*<sup>1,18</sup>.

## 1.16 JUSTIFICACION

En la actualidad las enfermedades respiratorias del cerdo siguen siendo un tema de preocupación para las granjas porcícolas debido a las altas pérdidas económicas que producen dichas infecciones. La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina es una enfermedad devastadora debido a que presenta una elevada tasa de mortalidad y con esto grandes pérdidas en la producción de cerdos, por lo que con este trabajo la FES Cuautitlan busca contribuir con la industria pecuaria brindándole mayor información del aislamiento de *App*, agente causal de dicha enfermedad, para mejorar el control de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

## 1.17 HIPOTESIS

- Si *Actinobacillus pleuropneumoniae* es aislado de pulmón entonces también será aislado de tonsila, pero si es aislado de Tonsila no necesariamente deberá encontrarse en pulmón.

## 2. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la posible presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en tonsilas y pulmones de cerdos mediante el aislamiento de dicho microorganismo.

### 2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar *Actinobacillus pleuropneumoniae* de pulmones y tonsilas de animales con signología de PCP.
- Relacionar el aislamiento de App en tonsila y pulmón.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Animales.

Los aislamientos se realizaron de 50 cerdos con signología de PCP, en etapa de crecimiento, con un peso de 12.0 a 15.0 Kg, de una granja de Nuevo León Monterrey.

#### 3.2 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados fueron Agar sangre, BHI (Infusión Cerebro Corazón), SS (*SalmonellaShigella*), Mac Conkey, SDA (Agar Dextrosa Sabraud), para lograr el aislamiento del *Actinobacillus pleuropneumoniae* y purificación del mismo. Para la elaboración de los medios los pasos a seguir fueron los siguientes: A) la disolución del medio en agua destilada con las proporciones e instrucciones marcadas por el proveedor del medio en el marbete de este. B) esterilización en autoclave por 15 minutos a una presión de 15 libras y a 121° C. Una vez estéril, el agar se sirve en cajas Petri y se espera la solidificación del mismo; estos medios ya solidificados se someterán a prueba de esterilidad incubándolos en la estufa bacteriológica a 37° C de 18 a 24 horas, una vez verificada la esterilidad de los medios son empaquetados y guardados en refrigeración hasta el momento de su uso.

#### 3.3 Necropsia.

Se sacrificaron todos los cerdos, se extrajeron los pulmones y las tonsilas de cada animal y se guardaron para su análisis en bolsas en las cuales fueron depositados el pulmón y la tonsila con su respectivo arete de identificación de cada animal para el control.

#### 3.4 Aislamiento de *App* a partir de pulmones y tonsilas.

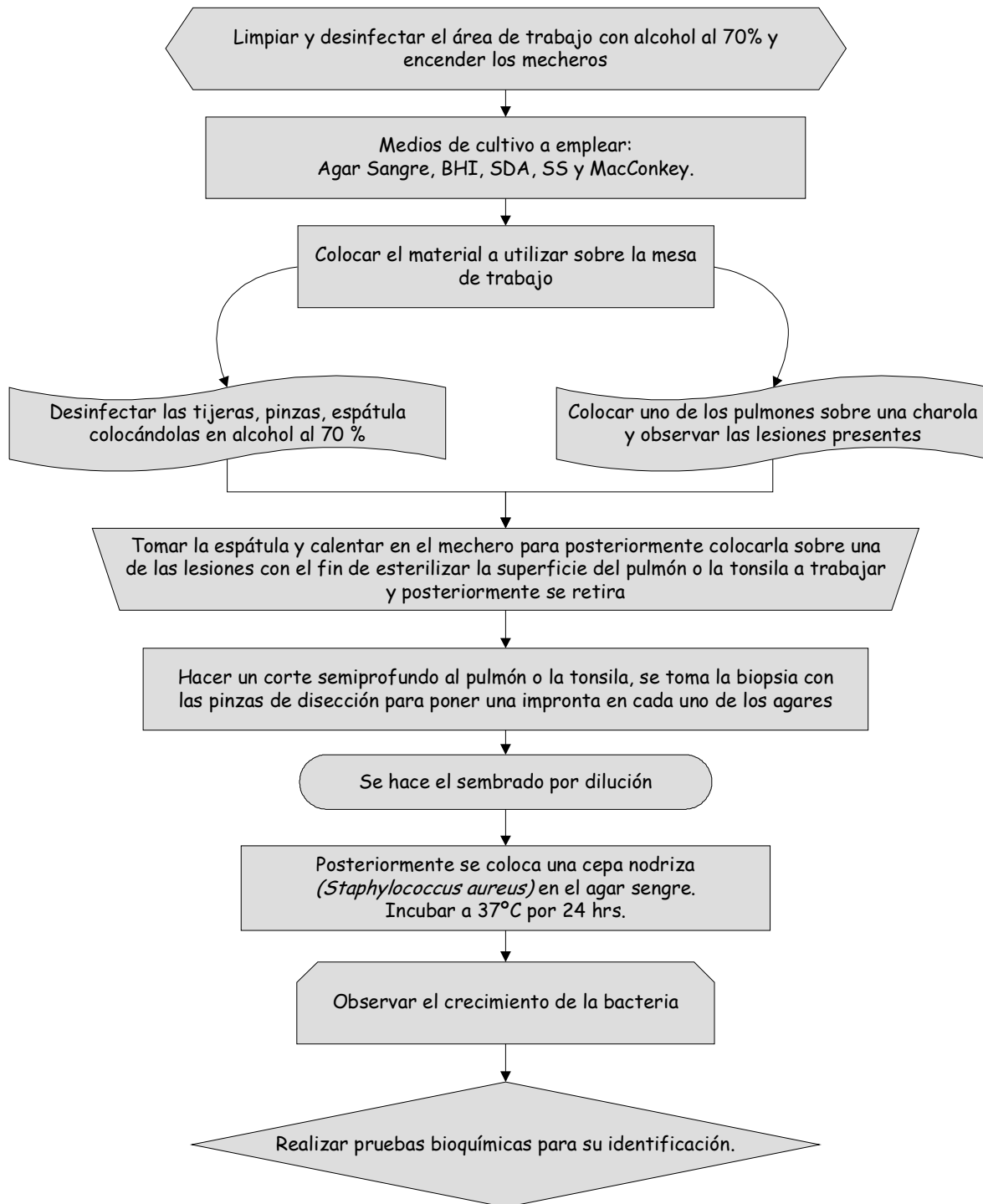
Se colocó un pulmón en la charola identificando las zonas de lesión en el lóbulo caudal, ya localizadas las zonas se procede con la espátula poniendo está al rojo vivo, se coloca por encima de la lesión para que el área este libre de bacterias oportunistas, con las tijeras y con la ayuda de las pinzas se hace un corte de aproximadamente de 1 - 2cm la cual se utiliza para poner una impronta en los medios de BHI, SS, Sangre, SDA, a la cual por medio del asa bacteriológica se

siembra en dilución, y se coloca una estría de cepa nodriza para lograr el aislamiento del *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la cepa nodriza a emplear fue *Staphylococcus aureus*. Se dejó incubar a 37°C por 24 horas, se observa y se interpretan los resultados. La identificación de los aislamientos se basó en sus caracteres morfológicos y bioquímicos siguiendo el criterio ya mencionado; se reseñaron las características de las colonias obtenidas, presencia o no de satelitismo alrededor de la colonia nodriza y presencia o no de hemólisis. La morfología de la bacteria fue evaluada después que el satelitismo fue sometido a la tinción de Gram. **Diagrama N° 1**

Con la tonsila del cerdo se procede de la misma manera.



Diagrama N°1. Secuencia del aislamiento de *App* a partir de pulmones y tonsilas



\* Desarrollar el mismo procedimiento para cada una de las muestras.

### 3.6 Identificación

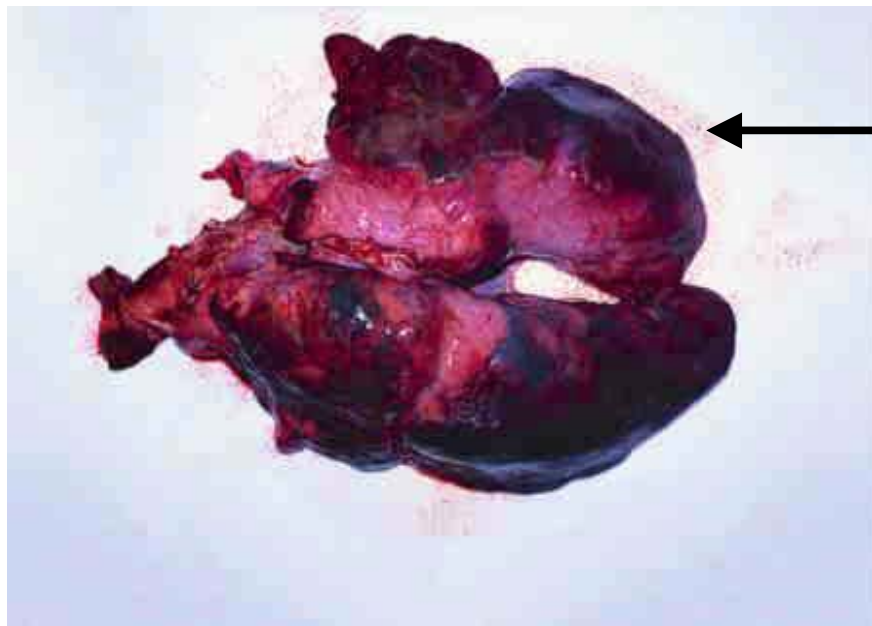
Para la identificación se baso en las características bioquímicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La tabla 1 nos muestra las diferentes pruebas bioquímicas empleadas para su correcta identificación <sup>27</sup>.

<b>Tabla 1.- Principales pruebas bioquímicas de <i>A. pleuropneumoniae</i></b>			
<b>Reacción bioquímica</b>	<b>Resultado</b>	<b>Reacción bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Requerimiento de factor V	+		
Indol	+	glucosa	-
Ureasa	+	fructosa	+
Ornitín descarboxilasa	-	sacarosa	+
Arginín dihidrolasa	-	lactosa	variable
Hemólisis	+*	xilosa	+
Hemaglutinación	-	ribosa	+
Reacción CAMP	+	manitol	+
Catalasa	variable		

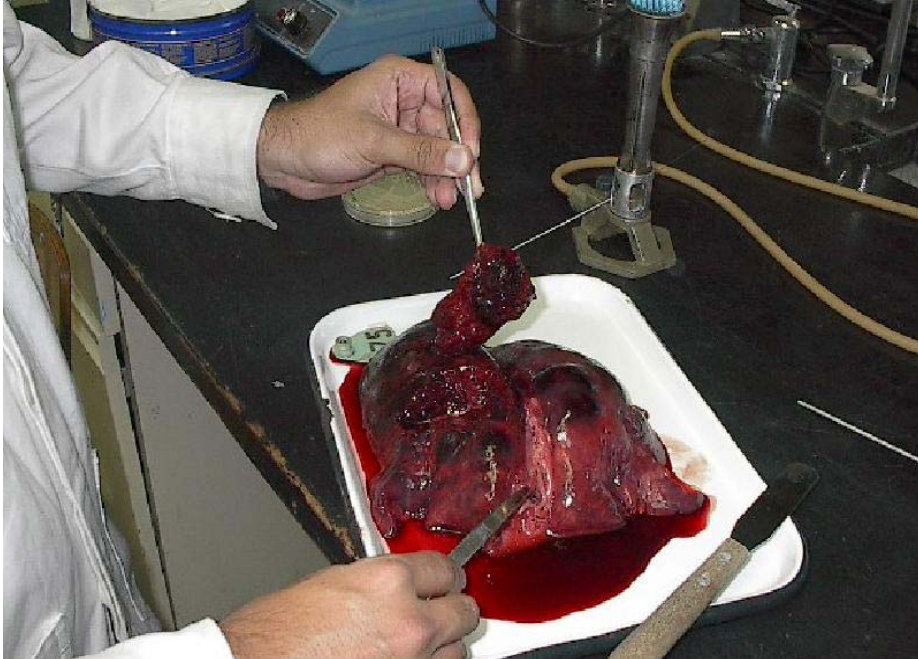
\* También se han descrito algunos casos de cepas no hemolíticas

#### 4. RESULTADOS

Después del sacrificio de los animales se procedió a la identificación de las lesiones típicas en los pulmones colectados de cerdos con Pleuroneumonía Contagiosa Porcina. Estas lesiones son hemorrágicas, infartadas y localizadas como se observa en la Fig. 1.



Lesion típica de *App*  
localizada en los  
lóbulos caudales.



El proceso que se realiza una vez identificada la lesión típica de PCP, se coloca el órgano de modo adecuado para tomar una muestra de este, para pasarla a un proceso de esterilización como se muestra en la Fig 2.

Se esteriliza el área de la lesión para el aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Se utiliza una espátula al rojo vivo y se coloca en la zona lesionada, esto va a permitir eliminar bacterias oportunista post mortem, una vez realizado se toma una muestra de la zona para su aislamiento. Fig 3

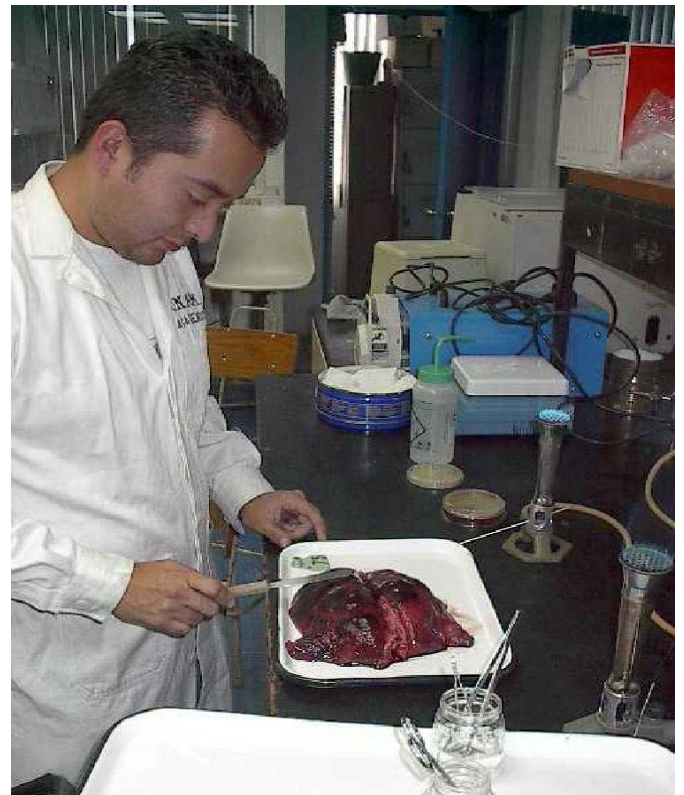




Fig 4 Realizado el proceso de esterilización del pulmón o la tonsila se lleva acabo el sembrado de el tejido sospechoso de presentar *Actinobacillus pleuropneumoniae* en agar BHI, agar sangre, SS, MacConkey y SDA, los cuales se dejaron incubando a 37°C por 24 horas y observándose el crecimiento.

Colocar en el agar Sangre una estría de la cepa nodriza para observar la dependencia de *App* al NAD por lo que hay que colocarla una vez que se siembre en este medio el tejido sospechoso de *App*. y de igual manera se incuba 24hrs, se observa y se le hacen pruebas bioquímicas para su identificación. Fig 5





## Identificación de colonias

Se aislaron colonias de *Actinobacillus pleuropneumoniae* las cuales fueron identificadas por la morfología y características reportadas en la literatura de dicho microorganismo así mismo se realizaron las pruebas bioquímicas de la tabla N°.1 y la dependencia de NAD, identificando a *App*.



Fig 6 Prueba de satelitismo positiva de la cepa aislada de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Por lo que se tiene al microorganismo para ser identificado mediante las pruebas bioquímicas y determinar su género y especie.

## Otros aislamientos

Además de aislar *App* en las tonsilas, se aislaron otras bacterias las cuales se identificaron como: *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, estas bacterias se aislaron debido a que la tonsila se encuentra en el tracto respiratorio superior y tiene mas contacto con agentes externos que pueden colonizarla además, de las bacterias conocidas como flora normal.

Los resultados se describen en las siguientes tablas se refieren a la obtención del aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en pulmones y tonsilas, arrojando datos que indican el aislamiento de dicho microorganismo en los medios de cultivo empleados en esta técnica para los dos órganos (pulmón y tonsila).

En la tabla N° 2 se observa de los 50 cerdos analizados 2 no presentaron *App*, ni en pulmones ni en tonsila, 3 cerdos presentan *App* solo en tonsila y 45 lo presentan tanto en pulmón como en tonsila. Esto nos indica que esos 2 animales para los que fue negativo el aislamiento estaban libres de *App* mientras que 3 cerdos presentaban infección a nivel de tonsila probablemente porque el sistema inmunológico de estos animales fue capaz de controlar la infección evitando su diseminación a pulmones y los 45 restantes fueron positivos al aislamiento de *App* en tonsila y pulmón confirmando que se trata de un brote de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

No. DE ANIMALES	AISLAMIENTO TONSILAS	AISLAMIENTO PULMON
2	Negativo	Negativo
3	Positivo	Negativo
45	Positivo	Positivo

TABLA N° 2: Número de animales positivos al aislamiento de *App* en tonsilas y pulmones.

La tabla N° 3 muestra en el 90% de la población que si *App* se aísla en pulmón también se aísla en tonsila, el 6 % indica que si *App* se aísla en tonsila no necesariamente esta en pulmón y el 4% que si no existe en tonsila tampoco esta en pulmón.

No. DE ANIMALES	AISLAMIENTO TON/PUL	PORCENTAJE DE ANIMALES
2	Neg / Neg	4 %
3	Pos / Neg	6 %
45	Pos / Pos	90 %

TABLA N° 3: Relación de aislamiento en tonsila y pulmón.

En la siguiente tabla se muestra que de los aislamientos positivos para *App*, el 96% fue de tonsilas y 90% de pulmones.

N° ANIMALES	PORCENTAJE AISLAMIENTO TONSILAS	PORCENTAJE AISLAMIENTO PULMONES
50	96 %	90 %

TABLA N° 4: Porcentaje de aislamiento en pulmones y tonsilas.



## 5. DISCUSIÓN

Para los métodos bacteriológicos se utilizaron muestras clínicas que incluyeron, generalmente, material de las lesiones pulmonares o de las tonsilas y siempre es preferible el trabajo con material fresco. Si la distancia desde la explotación al laboratorio es corta y se dispone de material conveniente para el traslado (neveras portátiles, convenientemente aisladas), lo mejor es incluir los pulmones enteros y las tonsilas por separado ya que en ocasiones si vienen en el mismo compartimiento es decir juntos pulmón y tonsila esta puede contaminar al pulmón y dar un resultado falso positivo por lo que se recomienda que se recolecten por separado. Una vez en el laboratorio se realiza la toma desde diversos lugares del pulmón, preferentemente de zonas con lesiones bien delimitadas, incluso encapsuladas, mejor de la periferia que del centro. Para simplificar el procedimiento pueden recogerse varias muestras mediante impregnación de escobillones o hisopos en el parénquima pulmonar al que se accede durante la necropsia después de cauterizar con una espátula al rojo la superficie del órgano. En cualquier caso, es conveniente la utilización de medios de transporte, como el medio de Stuart o de Amies, que prolongan la supervivencia del microorganismo lo que, si la distancia al laboratorio exige varias horas de viaje, es prácticamente una necesidad<sup>10,26</sup>.

El aislamiento a partir de animales con enfermedad aguda, por lo general, no plantea problemas importantes. En el caso de los portadores crónicos, sin embargo, la presencia de un número bajo de bacterias en el tracto respiratorio y su mezcla con la flora natural (presente en gran cantidad) dificulta enormemente su recuperación hasta el punto de que son habituales fracasos en animales comprobados enfermos por otros procedimientos<sup>32</sup>.

La identificación de *App*, ha de realizarse mediante reacciones bioquímicas y otras, resultando de especial utilidad la presencia de actividades ureasa,  $\beta$ -galactosidasa y fosfatasa alcalina, así como su capacidad hemolítica, que se puede exaltar sobre agar sangre de bovino u ovino por la acción sinérgica de la b-toxina de una cepa de *S. aureus* (efecto CAMP)<sup>19</sup>.

La tipificación bioquímica es una alternativa a otros métodos de diferenciación y, en primera instancia, sirve de base para la descripción de los biotipos I y II. Es evidente, sin embargo, que estos métodos difícilmente mejoran a los

inmunológicos, pero pueden ser útiles para cepas que presenten dificultades en la serotipificación. Los inconvenientes de la serotipificación tradicional incluyen la presencia de reacciones cruzadas y de cepas no tipificables<sup>27</sup>.

De los 50 pulmones, se aisló *Actinobacillus pleuropneumoniae* en 45 pulmones, lo que representa un 90 % una cifra de gran satisfacción para confirmar que se trata de un brote de PCP, esto refleja que en los 5 animales que no hubo aislamiento *Actinobacillus pleuropneumoniae* en pulmón, es debido a que la carga bacteriana no alcanzó a alojarse en pulmón seguramente por el status inmunológico del cerdo. Por lo que es necesario detectar los portadores sanos, además de controlar el destete temprano (la inmunidad materna dura de 5 a 9 semanas) y la separación de cerdos jóvenes de los otros animales<sup>9</sup>.

De las 50 tonsilas se obtuvo el 96% de aislamiento ya que solo se aisló *App* de 48 tonsilas esto hace pensar que la bacteria colonizó completamente la tonsila y pasó la barrera de defensa ya que como se sabe es una de los primeros sistemas de defensa ante las enfermedades respiratorias. así también se encontraron otros gérmenes secundarios que también se alojan en las vías superiores del tracto respiratorio, estas son comunes de encontrar en granjas que no tienen instalaciones adecuadas o con malas condiciones de higiene. De los 2 animales donde no se encontró hallazgos de *App* probablemente se debe a que no eran animales contagiados debido a su status inmunológico.

Estos son datos en los que se observa que un aislamiento adecuado al 100% de *App* se lleva a cabo en pulmones donde la PCP es mortal ya que el animal está en una etapa de la enfermedad donde el sacrificio sería el adecuado para él, pero no para el porcicultor. En la tonsila se observa que aunque *App* se haya encontrado a este nivel y no en pulmón el cerdo no está exento de la enfermedad ya que por el momento esta se podría combatir pero ¿por cuánto tiempo? Ya que se necesitarían condiciones óptimas en la granja, personal capacitado que deba seguir las normas de bioseguridad, así como un aislamiento del animal o animales enfermos para no contagiar a cerdos sanos.

Con estos resultados obtenidos se observó que en vías respiratorias altas (tonsilas) del cerdo se encuentra una de las barreras inmunológicas de defensa ya que una vez colonizada la tonsila por *Actinobacillus pleuropneumoniae* este viaja por linfa y sangre llegando a lóbulos caudales en pulmón causando graves daños. Además se encontró que en la tonsila y pulmones se pueden aislar otros

microorganismos como *Pasteurella sp*; *Escherichia coli*; *Salmonella sp*, ya que la tonsila tiene mayor contacto con bacterias que entran al tracto respiratorio así como con la flora normal existente en la zona.

Las características morfológicas encontradas del agente aislado fueron las de un organismo Gram negativo pleomórfico, no esporulado, con predominio de formas cocobacilares, dispuestos en forma aislada, en pares, cadenas o racimos. La dependencia de NAD fue manifiesta en todos los aislamientos ya que *Actinobacillus pleuropneumoniae* necesita del factor NAD para poder desarrollarse, siendo esta característica una de las principales para su identificación. Mas del 90% de las colonias de 24 a 48 horas en agar sangre y BHI presentaban bordes redondeados, color blanquecino. Las bacterias encontradas además *Actinobacillus pleuropneumoniae* podrían atribuirse a que están relacionadas con enfermedades del tracto urinario, pulmonares y heridas además de ser altamente invasivas principalmente en animales inmunosuprimidos<sup>1,20,26,27</sup>.

Aunque todos los serotipos son patógenos y capaces de producir pleuroneumonía, su virulencia varía en función de los factores propios del microorganismo y sus efectos de la condición inmune y de resistencia innata del hospedador. Cuando una pira está infectada con serotipos cuya virulencia ha disminuido por algún motivo y las consecuencias de la infección no son graves (en términos de mortalidad o lesiones), puede ser preferible convivir con el microorganismo que poner en práctica costosísimos programas de saneamiento. En una zahurda, sin experiencia inmunológica anterior, la entrada de una cepa virulenta puede ser causa de situaciones sanitarias muy perjudiciales. Existen vacunas eficaces (bacterinas) pero solo inmunizan contra serotipos homólogos (los que incluye la vacuna) mientras que los animales que sobreviven a la enfermedad natural (inmunidad natural) desarrollan inmunidad contra todos los serotipos<sup>1, 20, 23, 28,30</sup>.

Koen Chiers refiere a la colonización de la tonsila como paso fundamental de una detección *Actinobacillus pleuropneumoniae* debido a su afinidad por el tracto respiratorio del cerdo, y no hay autor en la literatura que concuerde con la hipótesis planteada en este trabajo.

En base a lo antes mencionado podemos decir que un buen diagnóstico oportuno permite evitar la muerte de estos animales por esta enfermedad (PCP), así como la pérdida económica para la porcicultura.

Los objetivos fijados en el trabajo se cumplieron aceptandose la hipótesis planteada en base a los resultados obtenidos.

## 6. CONCLUSIONES

- La hipótesis planteada se cumple, *Actinobacillus pleuropneumoniae* se puede aislar de tonsilas infectadas y pulmones, además de que una vez alojado en pulmones se puede recuperar en tonsilas, pero si esta alojado en tonsila no necesariamente en pulmón.
- De las 50 tonsilas, 48 fueron positivas al aislamiento de *App*, solo en 45 también se aisló de pulmones representando un 90.00%.
- La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina es una enfermedad altamente peligrosa y hay que saber diagnosticarla y encontrar un medio óptimo, de bajo costo y practico para poder prevenir y controlar la enfermedad así como en un futuro erradicarla.

## 7. REFERENCIAS

1. **Abel Ciprián Carrasco. Susana Mendoza E. Claudia García Meneses.** (1994). Afecciones Respiratorias del Cerdo. Primer Ciclo Nacional. Edit. UNAM. UAY. Lab Central de Mérida.
1. **Álvarez, M.C. Mendoza, E. S.** (1994). Manual Básico de Bacteriología. UNAM 1ª ed. México. pp77 -140.
2. **Annie Gagne, Sonia Lacouture; Andre Broes; Silvie D' allaire and Marcello Gottschalk** (1997). Development of an Immunomagnetic Method for selective Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 from Tonsils. Journal of clinical microbiology. Enero p.251 - 254.
3. **Delvental, S.; Henserl, A; Petzoldt. K.; Pabst, R.** (1992) *Actinobacillus pleuropneumoniae* effects of microbial Simulation on the number, size and activity of Bronchus \_ associated Lymphoid Tissue (Balt) Structures. International Journal of experimental Pathology. **73**:351-357.
4. **Falcón, N.A.** (1989). Efecto de virus de la Enfermedad de Aujeszky (Pseudo -rabia) sobre la presentación de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina. Tesis de maestría Fac. de Est. Sup. Cuautitlan. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. México.
5. **Gregory W. Stevenson DVM.** (1999). La neumonía bacteriana en Cerdos. PhD DDL, Purdue University, Wets Lafayette. USA. **47**: 907-1175.
6. **Gutiérrez CB. Tascon RI, García FJ. Vázquez J.A. Rodríguez Ferri E.F.** (1991) Diagnóstico de la pleuroneumonía porcina. Med. Vet; **8**:3-22.
7. **Haesebrouck F. Chiers K. Van Overbeke J. Ducatelle R.** (1997) *Actinobacillus pleuropneumoniae* in infections in pigs: the reole of virulence factors in pathogenesis and protection. Vet Microbiol; **58**:239-249.

8. **Hakan Vigre, Oystein Angen, Kristen Barfood, Dorte Thanning Lavritsen, Vibeke Sorensen.** (2002) Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field - like conditions: emphasis on tosillar colonisation and passively acquired colostral antibodies. *Veterinary Microbiology* p151-159.
9. **Hernández Ramírez Diego Francisco.** "Purificación y estudio de la antigenicidad de una proteína de membrana de 37 kd del *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1".
10. **J.W. Coulton, M.A. Hayes, M. Jacques, K. R. Mittal, D. F. Niven et M. Sirois.** Infections causées par *Actinobacillus spp.* Identification de nouveaux facteurs de virulence. [www.meduet.umontreal.ca/reseau/tra/themesfra/actino.htm](http://www.meduet.umontreal.ca/reseau/tra/themesfra/actino.htm)
11. **José de Jesús Williams, Marco A. Torres-León, Pilar Echeverría-Coello, Miguel P. Matos-Madina.** (2000). Aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en pulmones de cerdo con Pleuroneumonia crónica sacrificados en el rastro municipal de Mérida Yucatán, México. *Rev. Biomed.* **11** : 175-181.
12. **Julio Copes; Victoria Nievas, German Vigo, María Sánchez, Guillermo Bagnis, Vivian Martín, Hector Sanguinetti, Carlos Juan Perfumo.** (2001) Octubre-Diciembre. Aislamiento e identificación serológica de *Erisipelothrix rhusiopathiae* de cerdos con lesiones sistemáticas compatibles con las del mal rojo en la república de Argentina. Facultad de ciencias veterinarias Universidad Nacional de la Plata Argentina. **Vol.12** p.4
13. **Koen Chiers, Eef Donne; Ingrid Van Overbeke, richard Ducatelle, Freddy Haesebrouck.** (2002). Evaluation of serology, bacterioloical isolation and polymerase chain reaction for the detection of pigs carryng *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract after experimental. *Veterinary. Microbiology* **88**: 385 - 392

14. **Koen Chiers, Ingrid Van, Eef Donne, Margo Baele, Richard Ducatelle, Therry De Baere, Freddy Haesebrouck.** (2001). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and Tosillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide. *Veterinary Microbiology*. p.147-159
15. **Koneman, M.D.** (1999). *Diagnóstico Microbilógico*. Edt. Medica panamericana 5ta Ed. Argentina pp197, 224 -226.
16. **Mc fadin.** (1990). Prueba para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed panamericana, 1ª Edición; México, pp 183 - 184.
17. **Mendoza, E. S, Ciprián, C.A.** (2001). *Memorias del Tercer Ciclo Nacional de Enfermedades Respiratorias del Cerdo..* Edt. UNAM pp 102 - 112.
18. **Nahuel Fittipaldi Andre Broes Josée Harel Marylene Kobisch and Marcello.** (2003). Evaluation and Field Validation of PCR Test for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinacly infected pigs. *Journal of clinical microbiology*. p.5085 - 5093.
19. **Nakai, t, Ono, E; Ike, K and Kume, K.** (1992). Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by use of purified capsular polysaccharide or lipopolysaccharide. *Proceeding 12<sup>Th</sup> Int. Pig Vet: Soc., The Haugue, The Netherlands*, p.186. 1992
20. [pfizerah.com.mx/health](http://pfizerah.com.mx/health)
21. **Rigoberto Hernández Castro, Gilberto Chávez - gris José Ángel Gutiérrez - Pabello** (2002). Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biotipo 1, Serotipo 1, de pulmones de cerdo con y sin lesiones neumónicas utilizando la técnica de inmunohistoquímica. *Veterinary microbiology. Mex.* **33** (4).
22. **Robert Desrosiers.** Hechos y opiniones de todo el mundo. (2002) Julio. *International Pigletter. Vol.22, Num. 5*



23. **Robert Desrosiers** Hechos y opiniones de todo el mundo. (2003) Diciembre  
International Pigletter Vol. 23 Num. 10
24. SAGARPA Dirección general de asuntos agropecuarios y del campo.
25. **Sánchez VO<sup>1</sup>, González, D.<sup>2</sup>, Colmenares, VG.<sup>2</sup>, Mendoza, D-S<sup>1</sup>, Lara, H.<sup>3</sup>, Parrodi, F.<sup>3</sup>, Alcántara, T.<sup>1</sup>, Altamirano, FA.<sup>1</sup>, Juvenal, S.<sup>1</sup>, Sánchez A.<sup>1</sup>, López Ma. R., Esquivel, Ma. E., Ramos, D., Mendoza MA, Álvarez, Ma.C., Hernández, R. <sup>1</sup>, Oliva, D. <sup>1</sup>, Rodríguez, C. <sup>1</sup>, Trujillo, D. <sup>1</sup>, Vargas, S.A. <sup>1</sup>, Hernández-Baumgarten, E. <sup>1</sup>, Mendoza E. S. <sup>1</sup>, Ciprián C.A.** (2004) Aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de tonsilas y pulmones de cerdos vacunados y previamente desafiados <sup>1</sup>
- (1) FESC-Cuautitlán, UNAM. Campo, Posgrado; (2) CENID-Microbiología Veterinaria. INIFAP; (3) Boehringer-Ingelheim Vetmedica, S.A. de C.V.
26. sanidadanimal.info/cursos.com. Rodriguez - Ferri, E.F; Barceló, J; Gomez, S y Sánchez - Vizcaina , JM. *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
27. **Shope, R.** (2001). Porcine contagious pleuropneumonia. I. experimental transmisión, etology and pathology. J. Exp. Med. 119:357-368.
28. **T. Gram, P. Ahrens, M. Andreasen, J.P. Nielsen.** (2000). An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the apx and om a genes D evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs Danish Veterinary Laboratory. Buelowsvej27, DK - 1790 Copenhagen V, Denmark Vet. Microbiology 27
29. **V. Utera, a Gallardo de López y L. Mariño.** (1989). Pleuroneumonía Porcina En Venezuela; Estudio Clínico Post Mortem y Bacteriológico. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias
30. **Vaillancourt. J.** (1986). *Pleuropneumoniae* porcine: Estude sero-epidemiological the infection a *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 1 en elevages commeri Ciaux. MSc. University de Montreal

31. **Vargas Sánchez Alejandro.** "Evaluación económica y sanitaria de la despoblación-repoblación parcial combinada con el uso preventivo de alimento medicado y una bacterina, en una granja porcina infectada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
  
32. **Wood R.L Erysipelas.** (1999). *Actinobacillus pleuropneumoniae* In Disease of Swine. Ed. Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William I. Mengeling, David J. Taylor. 8a ed. Iowa, USA