



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

“Estudio comparativo de dos medios de cultivo (líquido) para el crecimiento
de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) Serotipos 1-10”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A N :

SARA SOTO MALDONADO
MARCO ANTONIO HERNÁNDEZ BEDOLLA

ASESORES: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ
DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
DR. JOSÉ ABEL CIPRIÁN CARRASCO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZADA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

"Estudio comparativo de dos medios de cultivo (líquido) para el crecimiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) Serotipos 1-10".

que presenta la pasante: Sara Soto Maldonado
con número de cuenta: 09930008-7 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Noviembre de 2006.

PRESIDENTE	Dr. Abel Ciprian Carrasco	
VOCAL	MVZ. Gerardo Cruz Jiménez	
SECRETARIO	Dr. Eliseo Hernández Baumgarten	
PRIMER SUPLENTE	Dr. Enrique Salas Téllez	
SEGUNDO SUPLENTE	MC. Ma. Guadalupe Aviles Robles	



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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENT :

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

"Estudio comparativo de dos medios de cultivo (líquido) para el crecimiento de Actinobacillus pleuropneumoniae (App) Serotipos 1-10".

que presenta el pasante: Marco Antonio Hernández Bedolla
con número de cuenta: 09915885-7 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Noviembre de 2006.

PRESIDENTE	<u>Dr. Abel Ciprian Carrasco</u>	
VOCAL	<u>MVZ. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Eliseo Hernández Baumgarten</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dr. Enrique Salas Téllez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Ma. Guadalupe Aviles Robles</u>	

MUCHAS GRACIAS ...

DIOS por haberme permitido llegar a este momento y alcanzar una de las metas más importantes de mi vida: terminar mi carrera.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por abrirme sus puertas y haberme aceptado como alumna de esta importante institución.

A todos mis PROFESORES de la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN por compartir sus conocimientos y experiencias de las asignaturas que impartían, los cuales aprovecharé para desempeñarme cada vez mejor en mi vida profesional.

A mis asesores de tesis: Dr. ABEL CIPRIÁN por confiar en mí para asignarnos este proyecto, por brindarnos todas las herramientas necesarias para la elaboración del mismo y por supuesto por la amistad y el apoyo que me ha brindado; al maestro GERARDO CRUZ, por aceptarme en su equipo de trabajo, por todos los consejos, las enseñanzas, la confianza y lo mejor de todo ... por la amistad incondicional que en todo momento me ha otorgado. A ambos muchas muchas gracias por todo.

A la Dra. SUSANA MENDOZA por abrirnos las puertas del laboratorio de Virología y permitirnos trabajar en él.

A MARCO por considerarme e invitarme a realizar este trabajo juntos, fueron muchas horas de trabajo, pero ya ves... ¡¡¡si se pudo!!! No fue cantidad sino calidad ¿o no?

A las personas que trabajan en el laboratorio 10 de Microbiología: Sra. ERICKA, MONY, LUPITA, TERROR y MARÍO, por la amistad tan bonita que pudimos formar, gracias por todos los momentos divertidos que vivimos, la confianza, el apoyo que nos dieron en esos días de curva de crecimiento, no sé que hubiéramos hecho sin ustedes.

A la GENERACIÓN 29, a mis compañeros (as) y amigos (as) de la Facultad que hicieron que disfrutara más el estudio de mi carrera. Muy en especial a ti ALICIA por el grandísimo hecho de ser mi amiga y confidente, a ti LUPE ya que a pesar de los años seguimos compartiendo momentos juntos, a ti MARI que te conozco desde primer semestre y me sigues tratando como si fuera el primer día, gracias por los consejos. Y claro no puedo olvidar a: ROSA, ROSITA, ITZEL, CARLITOS, DIANITA, FER, IVÁN, con quienes he compartido momentos muy especiales, gracias por la amistad que me brindan.

A toda MI FAMILIA, por todo el cariño y apoyo, por estar al pendiente de lo que me pase, tampoco se que haría sin ustedes.

A ti DEIVIS, por estar a mi lado desde el principio hasta el fin, como siempre lo has hecho, por motivarme a que realice lo que me proponga, tú sabes lo difícil que fue llegar hasta este momento. Gracias por estar al pendiente y ser mi motivación para seguir adelante. Aún nos falta camino por recorrer: ¡¡¡vamos a echarle ganas!!!

A quienes han dado todo para que MAURICIO y yo salgamos adelante, a quienes se han esforzado y me han otorgado todo sin querer recibir nada a cambio... Gracias de todo corazón a ANGELA y ALFREDO, mis padres. Les prometo que no los defraudaré y les daré más satisfacciones a lo largo de mi carrera profesional.

Finalmente, quiero decirles a todos ustedes que Los Quiero Muchísimo y nuevamente GRACIAS por formar parte importante de mi vida.

SARA SOTO MALDONADO

MUCHAS GRACIAS

DIOS, por darme el privilegio de existir y tener una labor aquí en la tierra, la cual poco a poco he ido desarrollando y que con el paso de la vida podré llevarla a cabo. Por lo mientras, hoy he cumplido con una de sus metas y espero que las que me deparen sean igual de exitosas y satisfactorias.

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** nuestra máxima casa de estudios, de la cual es un orgullo y privilegio pertenecer. Primeramente tener las bases en mi adorado CCH Azcapotzalco y posteriormente en la querida FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN cosechar lo que en este lapso de tiempo fui sembrando con la ayuda de todos aquellos profesores que me brindaron su conocimiento, apoyo y amistad en pro de mi formación profesional.

A quienes les estaré agradecido siempre, profesoras: Vicky Benítez, Arcadia Hernández, María Esther Revueltas, Patricia Campos, Adriana Ganem, Dulce Sid Ruvalcaba y Lupita Áviles. Los profesores: Enrique Ramos, Enrique Ángeles, René Miranda, Jorge Torres, Gerardo Cruz y Enrique Salas.

A mis asesores de tesis: Maestro **GERARDO CRUZ**, que un día llegue por circunstancias de la vida, a pedirle ayuda con el desarrollo de un proyecto académico a su laboratorio; usted con la capacidad tan enorme que tiene de brindar la mano, su conocimiento, tiempo y amor a su profesión; me invito a formar parte del equipo de trabajo que deseaba cumplir con este objetivo; lo cual le estaré profundamente agradecido, además de que me dejo conocer y aprender un poco más de aquella persona que me ha brindado su amistad incondicionalmente y que fortaleció aún más este vínculo, en donde el fruto más importante es esta tesis. Doctor **ABEL CIPRIÁN** a usted que le puedo decir, es el director principal de este proyecto, quién depositó la confianza en Sarita y en mí, permitiéndonos conocer, tratar y trabajar con una eminencia que ha dado esta Facultad y la Universidad misma; gracias por todo el apoyo ofrecido y más que eso por la amistad que se origino y que deseo de todo corazón perdurará y permita en un futuro emprender nuevos propósitos. Doctora **SUSANA MENDOZA** por brindar todas las facilidades en el empleo de equipos, reactivos y cubículos que conforman el laboratorio de Virología en Posgrado nuestra segunda casa.

A mi coequipera y jefa **SARITA**, quién es una persona única por todo lo que eres y puedes ser, y que eres una pieza valiosa del gran rompecabezas que consiguió este orgullo y gozo; que a pesar de las condiciones, limitaciones y sufrimientos que pasamos, fue algo maravilloso compartirlo contigo. Y como tú lo citas se pudo y la calidad es la que salió a relucir, ¡¡¡como tenía que ser!!!

A todas aquellas personitas que estuvieron involucradas y que trabajan en el laboratorio 10 de Microbiología: **Sra. ERIKA, MONY, LUPITA, ULISES y MARÍO**; por el ambiente de familia que se formó, las vivencias y apoyo a cada momento en este proyecto, que se llevo a cabo y que ustedes son parte importante de este resultado GRACIAS....

A la **Generación 29**, quienes me brindaron su mano, amistad y apoyo incondicional; de los cuales no quisiera ser menos a alguien pero si mencionar a los que compartieron alguna vivencia, alegría, sufrimiento, nostalgia, consejo y corazón. A ti: Karina, Denise, Liz, Johnny, Susana, Griselda (pequeña diablura), Omeida, Lizbeth, Betrix, Celeste (mamá peluche), Carlitos, Chava, David, Fer; a todos aquellos que han pasado por el mejor equipo el PKP, gracias por ser parte de la gran familia que es nuestra generación.

A la **Generación 30**, los cuales me permitieron convivir en este año con muchos de sus integrantes: Itzmel, Angélica, Lety, Tania, Zaida, Nelly, Liz, Pilar, Mireya, Daniela, Jorge, Alejandro, Carmen, Dalila, Marduck, Tamara, Lupita, Aída, María y Ana; entre muchas más personas que junto a las mencionadas me ha dejado conocer, convivir, y tener experiencias muy bonitas que las llevare por siempre en el corazón y desde el fondo de este desearles lo mejor en su vida.

A la **Generación 31**: Olivid, Mara, Citlalli, Diana, Vero, Iris, Brenda, Eli, Marisol, Mariana, Bety, Miguel, Darío; quienes son personas muy queridas, confiables y exitosas; las cuales tengo ya un tiempo considerable de compartir la vida universitaria y personal; esperando que su futuro sea redituable y en armonía.

A la **Familia Hernández y Bedolla**, quienes son muy importantes para mí y cada uno de sus integrantes tienen un cariño especial, desde el sobrino más pequeño hasta mis abuelitos; gracias por dejarme ser parte de estas grandes familias.

Finalmente a mis padres y hermano quienes han confiado, apoyado y creído en mí. Mis padres que ha permitido que Jonathan y yo tengamos un futuro mejor, aprovechando y sacando lo mejor de esta vida; para que seamos hombres de bien.

Muchísimas gracias a todos, y a los que me faltaron de citar, siempre estarán presentes en mi pensamiento

MARCO ANTONIO

Este trabajo se lo dedico a las personas más importantes de mi vida ...

MIS PADRES:

Angela Maldonado ya que sin ti no hubiera logrado llegar hasta donde estoy.
Gracias por tus consejos, por tu ejemplo, tus enseñanzas, tu apoyo y sobre todo...
por quererme como lo haces.
Eres la persona más maravillosa que conozco y a la que más quiero en esta vida.

Alfredo Soto ya que a pesar de la distancia nunca te has olvidado de tu familia.
Muchas gracias por preocuparte y hacer todo lo posible para que salgamos adelante.
Te admiro por ser una gran persona que aprecio y valoro muchísimo, eres mi ejemplo a seguir.

¡¡¡ LOS AMO CON TODA MI ALMA!!!

MI HERMANO:

Mauricio Soto, recuerda siempre que te queremos muchísimo
y que cuentas conmigo para lo que necesites.
¿Sabes? Siempre quise ser como tú, te admiro como no tienes idea.

MI FAMILIA (SOTO y MALDONADO):

*Este trabajo también es para ustedes, forman parte importante de todo lo que hago.
A los pequeños y no tan pequeños, ojala les sirva de ejemplo.
¡¡¡Echenle ganas!!! Los Quiero Mucho.*

MAYQN:

T. David López, eres lo mejor que pudo pasarme desde que inicie la carrera, llegaste
en el momento exacto y no puedo dejar de agradecerte que seguimos estando uno
al lado del otro, gracias por hacerlo posible.
Y ¿sabes que?... formamos el mejor equipo del mundo.

*Recuerda que todo es posible en esta vida, solo se paciente y nunca olvides que eres
único y muy valioso, sobre todo para mi.
TE AMO CON TODA MI ALMA.*

SARA SOTO MALDONADO

“La carrera no siempre la ganan los más veloces sino aquellos que siguen corriendo”

Este trabajo se lo dedico a las personas más importantes de mi vida ...

EN MEMORIA:

De mi abuelito Cayetano Hernández, quién a pesar de ser muy reservado fue una persona grandiosa; mis dos Abuelitas Remedios Morillón y María de Jesús Torres quienes la vida no dejo que las conociera, pero que los llevo en el corazón.

ABUELITO:

***SIMEÓN BEDOLLA**, quién es una persona extraordinaria con una gran fortaleza, inteligencia, humanidad, memoria y amor; abuelito tú marquito que TQM logró una meta que también es tuya.*

MIS PADRES:

***ROSALINA BEDOLLA**, mi madrecita hermosa, quién es una mujer excepcional en todos los sentidos; la cual a su amor, comprensión, consejos, jalones de orejas y mano dura, a hecho que se tome el valor real de esta vida y que uno de los tanto frutos, que en su etapa de mamá se fijo se refleja en este trabajo, el cual es para y por ti.*

***LEÓN HERNÁNDEZ**, un padre único, el cuál ha forjado una familia armoniosa y unida. Quién a pesar de las adversidades del destino, uno de sus tantos sueños como persona se ha cumplido. Eres lo máximo pa' una persona inteligente, sencilla y de carácter fuerte, que ha permitido que veamos la realidad que nos depara. Esto es tuyo y disfrútalo.*

iii A LOS DOS LOS AMO Y SON MI MAYOR EJEMPLO!!!

MI HERMANO:

***Jonathan Hernández**, sabes que eres muy especial para mí, te Amo carnal. Mi hermanito Chan como te llamo, sabes que la vida tiene muchas satisfacciones y obstáculos; en todo esto, cuentas conmigo para compartirlo y sacarle el mejor provecho, échale ganas para que coseches las metas que te fijes.*

FAMILIA HERNÁNDEZ y BEDOLLA

Eso es para todos lo tíos (as), primos (as), sobrinos (as); a quienes les queda como ejemplo que lo que uno se propone se consigue con dedicación, pasión y amor.

MIS PADRINOS

***ESPERANZA y ELADIO**, quienes son como mis segundos padres y los cuales quiero y adoro muchísimo. Aquí tienen una de tantas metas que tengo en esta vida; es para ustedes.*

AMIGAS QUERIDAS

***Vivis, Mony, Liz Tapia, Karina, Denise, Susana, Gris, Itzmel, Nelly, Carmen, Tania y Anahí**; cada una de ellas tiene un cariño especial, esto es de ustedes, porque han estado conmigo apoyándome y motivando a que lo conseguido se llevara acabo. Cada una me ha abierto su corazón y me han brindado su confianza y permitir que esta amistad sea única con cada una de ellas. Todas son fuertes, inteligentes, de un valor especial y que estarán y guardaran por siempre un lugar en mi corazón y en mi mente.*

MIS COMPADRES Y HERMANOS

***Lupita, Lidia, Nancy, Laura, Josy, George, Carlos, Juan, Macip y Abraham**, los cuales me han demostrado una amistad única, en quienes me han tendido la mano, no falta el consejo o el regaño pero bien vale la pena tener a gente como ustedes de **AMIGOS**. Saben que los quiero mucho y esperemos que esto perdurará por siempre y las locuras que vivimos nunca se terminen.*

MARCO ANTONIO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	3
1.1.1 Antecedentes	
1.1.2 Características generales y morfológicas	
1.1.3 Taxonomía y clasificación	
1.1.4 Características de crecimiento y cultivo	
1.1.5 Características metabólicas	
1.1.6 Localización	
1.1.7 Transmisión	
1.1.8 Factores de virulencia	
1.1.9 Epidemiología	
1.1.10 Signos clínicos	
1.1.11 Lesiones	
1.1.12 Diagnóstico	
1.1.13 Tratamiento	
1.1.14 Prevención y control	
1.2 ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA.....	14
1.3 PRIONES	22
1.4 MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>App</i>	25
1.4.1 Todd – Hewitt	
1.4.2 Soya – Trypticaseína	
1.4.3 Agar Sangre	
1.4.4 Agar Chocolate	
1.4.5 Medio Pleuroneumonía-like organisms PPLO	
1.4.6 Infusión Cerebro – Corazón	
1.4.7 Medio PECE	
1.5 CURVA DE CRECIMIENTO.....	29
1.6 MEDIDAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO: RECuento DE CÉLULAS TOTALES Y VIABLES.....	31
2. JUSTIFICACIÓN	33

3.	HIPÓTESIS	34
4.	OBJETIVOS	35
4.1	GENERAL	35
4.2	PARTICULARES.....	35
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
5.1	MATERIALES.....	36
5.1.1	Material de laboratorio	
5.1.2	Material biológico	
5.1.3	Equipo	
5.1.4	Reactivos	
5.2	METODOLOGÍA	38
5.2.1	Preparación de medios de cultivo	
5.2.1.1	Medios sólidos	
5.2.1.2	Medios líquidos	
5.3	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	40
5.3.1	Reactivación de la cepa bacteriana	
5.3.2	Identificación	
5.4	CURVA DE CRECIMIENTO.....	42
5.5	CUENTA VIABLE EN PLACA	43
6.	DIAGRAMA DE TRABAJO	45
7.	RESULTADOS.....	46
7.1	MEDIOS DE CULTIVO BHI Y PECE	46
7.2	IDENTIFICACIÓN DE <i>App</i>	46
7.2.1	Gram	
7.2.2	Catalasa, Oxidasa, Oxidación – Fermentación de glucosa y motilidad	
7.2.3	Prueba de CAMP	
7.2.4	Satelitismo	
7.3	CURVA DE CRECIMIENTO.....	49
7.3.1	Crecimiento del S-1 de <i>App</i> en medio BHI y PECE.	
7.3.2	Crecimiento del S-2 de <i>App</i> en medio BHI y PECE.	
7.3.3	Crecimiento del S-3 de <i>App</i> en medio BHI y PECE.	
7.3.4	Crecimiento del S-4 de <i>App</i> en medio BHI y PECE.	
7.3.5	Crecimiento del S-5a de <i>App</i> en medio BHI y PECE.	
7.3.6	Crecimiento del S-6 de <i>App</i> en medio BHI y PECE.	
7.3.7	Crecimiento del S-7 de <i>App</i> en medio BHI y PECE.	
7.3.8	Crecimiento del S-8 de <i>App</i> en medio BHI y PECE.	
7.3.9	Crecimiento del S-9 de <i>App</i> en medio BHI y PECE.	
7.3.10	Crecimiento del S-10 de <i>App</i> en medio BHI y PECE.	

7.4 CUENTA VIABLE EN PLACA	61
7.4.1 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 1 en BHI y PECE.	
7.4.2 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 2 en BHI y PECE.	
7.4.3 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 3 en BHI y PECE.	
7.4.4 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 4 en BHI y PECE.	
7.4.5 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 5a en BHI y PECE.	
7.4.6 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 6 en BHI y PECE.	
7.4.7 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 7 en BHI y PECE.	
7.4.8 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 8 en BHI y PECE.	
7.4.9 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 9 en BHI y PECE.	
7.4.10 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 10 en BHI y PECE.	
7.5 ESTUDIO DE CORRELACIÓN	71
7.5.1 Relación absorbancias y cuenta viable del S-1	
7.5.2 Relación absorbancias y cuenta viable del S-2	
7.5.3 Relación absorbancias y cuenta viable del S-3	
7.5.4 Relación absorbancias y cuenta viable del S-4	
7.5.5 Relación absorbancias y cuenta viable del S-5a	
7.5.6 Relación absorbancias y cuenta viable del S-6	
7.5.7 Relación absorbancias y cuenta viable del S-7	
7.5.8 Relación absorbancias y cuenta viable del S-8	
7.5.9 Relación absorbancias y cuenta viable del S-9	
7.5.10 Relación absorbancias y cuenta viable del S-10	
8. DISCUSIÓN	82
9. CONCLUSIONES	90
10. SUGERENCIAS	91
11. APÉNDICE	92
11.1 TABLAS.....	92
11.1.1 Curva de crecimiento	
11.1.2 Cuenta viable	
11.2 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	102
12 GLOSARIO	103
13 REFERENCIAS.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. EEB: Datos de los primeros casos nativos..... 17

Figura 2. Mapa de Distribución Geográfica [OIE]. 17

Figura 3. Reduciendo el riesgo de exposición a EEB en bovinos ganado y humanos..... 18

Figura 4. Curva de crecimiento microbiano en un sistema cerrado..... 30

Figura 5. Caldos BHI y PECE 46

Figura 6. Prueba positiva del fenómeno de CAMP de *App* 47

Figura 7. Resultado de la Prueba de Satelitismo del S – 8 en placas de agar sangre y agar BHI..... 48

Figura 8. Resultado de la Prueba de Satelitismo en placas de agar sangre y agar BHI del S – 9..... 49

Figura 9. Resultados del requerimiento del factor V en placas de agar BHI / NAD de los S-8 y S-9. 49

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Tendencia positiva que muestra el S-1 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.....	50
Gráfica 2. Tendencia positiva que muestra el S-2 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.....	51
Gráfica 3. Tendencia positiva que muestra el S-3 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.....	52
Gráfica 4. Tendencia positiva que muestra el S-4 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.....	53
Gráfica 5. Tendencia positiva que muestra el S-5a durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.....	55
Gráfica 6. Tendencia positiva que muestra el S-6 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.....	55
Gráfica 7. Tendencia positiva que muestra el S-7 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.....	57
Gráfica 8. Tendencia positiva que muestra el S-8 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.....	58
Gráfica 9. Tendencia positiva que muestra el S-9 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.....	59
Gráfica 10. Tendencia positiva que muestra el S-10 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE	60
Gráfica 11. UFC / ml del S-1, de la cuenta viable en placa, del caldo BHI y PECE., durante un período de doce horas	62
Gráfica 12. UFC / ml del S-2, de la cuenta viable en placa, del caldo BHI y PECE., durante un período de doce horas.....	63
Gráfica 13. UFC / ml del S-3, de la cuenta viable en placa, del caldo BHI y PECE., durante un período de doce horas.....	64
Gráfica 14. UFC / ml del S-4, de la cuenta viable en placa, del caldo BHI y PECE., durante un período de doce horas.....	65
Gráfica 15. UFC / ml del S-5a, de la cuenta viable en placa, del caldo BHI y PECE., durante un período de doce horas.....	66
Gráfica 16. UFC / ml del S-6, de la cuenta viable en placa, del caldo BHI y PECE., durante un período de doce horas.....	67
Gráfica 17. UFC / ml del S-7, de la cuenta viable en placa, del caldo BHI y PECE., durante un período de doce horas.....	68

Gráfica 18. UFC / ml del S-8, de la cuenta viable en placa, del caldo BHI y PECE., durante un período de doce horas.....	69
Gráfica 19. UFC / ml del S-9, de la cuenta viable en placa, del caldo BHI y PECE., durante un período de doce horas.....	69
Gráfica 20. UFC / ml del S-10, de la cuenta viable en placa, del caldo BHI y PECE., durante un período de doce horas.....	70
Gráfica 21. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-1 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.	71
Gráfica 22. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-2 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.	72
Gráfica 23. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-3 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.	73
Gráfica 24. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-4 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.	74
Gráfica 25. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-5a en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.....	75
Gráfica 26. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-6 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.	76
Gráfica 27. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-7 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.	77
Gráfica 28. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-8 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.	78
Gráfica 29. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-9 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.	79
Gráfica 30. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-10 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.....	80
Gráfica 31. r^2 obtenidas en el estudio de correlación entre absorbancias y UFC/ml de los serotipos de App 1 al 10 en los medios BHI y PECE.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Determinaciones principales y diferenciación metabólica de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	6
Tabla 2. Toxinas Apx producidas por diferentes serotipos de App.	8
Tabla 3. Distribución geográfica de los serotipos de App en el mundo.	9
Tabla 4. Cronología de los eventos básicos de la EEB a nivel mundial.	16
Tabla 5. Finalmente en la 73ª sesión del 24 de mayo de 2005 se alcanzó un acuerdo sobre el procedimiento simplificado de categorización y sobre las normas de vigilancia.	19
Tabla 6. A partir de las evaluaciones geográficas de los riesgos, el CDC clasifica a los países en cuatro categorías.	19
Tabla 7. Propiedades físicas, químicas y biológicas de los priones.	23
Tabla 8. Enumeran las enfermedades prion conocidas hasta ahora y alguna información nomenclatural referente a ellas. * Encefalopatías Espongiformes reconocidas por la OIE.	24
Tabla 9. Formulación del medio BHI.	27
Tabla 10. Formulación del medio PECE	28
Tabla 11. Cepas ATCC de App utilizadas	37
Tabla 12. Dilución final de las alícuotas tomadas de BHI y MN, en cada hora de la curva de crecimiento para realizar las cuentas viables en placa.	43
Tabla 13. Resultados de los serotipos 1 – 10 a las pruebas de catalasa, oxidasa, O/F y motilidad.	47
Tabla 14. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-1 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.	92
Tabla 15. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-2 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.	92
Tabla 16. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-3 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.	93
Tabla 17. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-4 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.	93
Tabla 18. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-5a de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.	94
Tabla 19. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-6 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.	94

Tabla 20. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-7 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.	95
Tabla 21. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-8 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.	95
Tabla 22. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-9 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.	96
Tabla 23. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-10 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.	96
Tabla 24. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-1 en caldo BHI y PECE.	97
Tabla 25. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-2 en caldo BHI y PECE.	97
Tabla 26. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-3 en caldo BHI y PECE.	98
Tabla 27. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-4 en caldo BHI y PECE.	98
Tabla 28. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-5a en caldo BHI y PECE.	99
Tabla 29. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-6 en caldo BHI y PECE.	99
Tabla 30. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-7 en caldo BHI y PECE.	100
Tabla 31. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-8 en caldo BHI y PECE.	100
Tabla 32. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-9 en caldo BHI y PECE.	101
Tabla 33. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-10 en caldo BHI y PECE.	101

LISTA DE ABREVIATURAS

(+)	Positivo
(-)	Negativo
<i>App</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
APX	Exotoxina de <i>App</i> (porinas)
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusión Cerebro Corazón
°C	Grados centígrados
CAMP	Christie, Atkins y Munch-Petersen
c.b.p.	Cuanto baste para
CDC	Comité Director Científico
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEB	Encefalopatía Espongiforme Bovina
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EET	Encefalopatías Espongiformes Transmisibles
EEB	Encefalopatía Espongiforme Bovina
EU	Estados Unidos
g	Gramos
GB	Gran Bretaña
GBR	Riesgo Geográfico
HCH	Harina de Carne y Huesos
hrs	Horas
IgA	Inmunoglobulina A
INC.	Incontables
kDa	Kilodalton
lb.	Libras
LPS	Lipopolisacáridos
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
MER	Materiales Específicos de Riesgo
min	Minuto (s)
ml	Mililitros
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
O/F	Oxidación - Fermentación
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
ONPG	o - nitrofenil - β - D - galactopiranosido
PCP	Pleuroneumonía Contagiosa Porcina
PM	Peso molecular
PPLO	Pleuroneumonía-like organisms
PrP	Proteína Prion
PrP _c	Proteína celular
PrP _{sc}	Proteína celular infectiva o Scrapie
rpm.	Revoluciones por minuto
RTX	Toxinas repetidoras
SNC	Sistema Nervioso Central
SSFE	Solución Salina Fisiológica Estéril
S-1	Serotipo uno
S-2	Serotipo dos
S-3	Serotipo tres
S-4	Serotipo cuatro
S-5a	Serotipo cinco a
S-6	Serotipo seis
S-7	Serotipo siete
S-8	Serotipo ocho
S-9	Serotipo nueve
S-10	Serotipo diez
UE	Unión Europea
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

RESUMEN

Actinobacillus pleuropneumoniae (*App*) es una bacteria Gram negativa, que provoca una enfermedad en cerdos llamada Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, la cual esta distribuida mundialmente y ha causado pérdidas severas en la industria porcina. Los veterinarios y porcicultores ante esta preocupación toman medidas preventivas para que sus animales no se enfermen; entre ellas, podemos mencionar principalmente la vacunación del ganado, utilizando una bacterina.

Las bacterinas son productos biológicos inactivados que pueden estar compuesto por cultivos de algunos de los 15 serotipos de *App*; así como también, por subunidades de la bacteria como son las proteínas de membrana externa o las toxinas que liberan al romperse (*ApxI*, *ApxII* y *ApxIII*) que son las que provocan el daño mas severo en tejidos pulmonares.

Los cultivos de *App* que se requieren para la elaboración de las bacterinas, se desarrollan en un medio de cultivo enriquecido denominado Infusión cerebro – corazón (BHI). Este medio es una fuente riesgosa ya que puede contener la forma infectiva de un agente proteico denominado prion, debido a que contiene un extracto de cerebro de bovino. El prion que es causante de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), se aloja principalmente en tejidos del Sistema Nervioso Central.

Muchos productos biológicos, incluyendo la bacterina mencionada, pueden estar suplementados con sustancias de origen bovino y se comercializan mundialmente con fines de investigación; pero, por temor a que el agente etiológico de la EEB entre a países donde no se han registrado casos de esta enfermedad, se ha restringido la entrada de estos.

Actualmente, se buscan alternativas para erradicar la presencia del prion en los productos biológicos. Este trabajo contribuye a dicho objetivo, evaluando un nuevo medio de cultivo líquido, en el que se sustituyo la infusión cerebro – corazón por extractos y peptonas, las cuales aportan los nutrientes proteicos que necesita la bacteria para desarrollarse tal y como lo hace el BHI.

Este estudio, se realizó empleando cepas ATCC de los serotipos 1 al 10 de *App*. Se analizaron los caldos BHI y PECE (Proteosa peptona, Extracto de carne, Caseína y Extracto de levadura) utilizando curvas de crecimiento de doce horas y cuentas viables en placa determinando las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml). Todo esto con el propósito de compararlos y conocer si el medio a probar favorece el desarrollo de *App* de forma similar que el BHI.

Al concluir la fase experimental, observamos que todos los serotipos de *App* que se probaron en este experimento (1 a 10, excepto el 2), lograron crecer satisfactoriamente en PECE, por lo tanto es efectivo para el desarrollo de esta bacteria. Cabe mencionar que aunque todos se desarrollaron en ambos medios hubo diferencias de crecimiento entre cada uno de ellos. Los serotipos que tuvieron un comportamiento similar en BHI y en PECE fueron el S-9 y S-10; la conducta que presentaron los S-5a y S-7 en PECE fue mejor a la que desarrollaron en el caldo BHI; los S-3, S-4 y S-6 se desarrollaron en BHI de forma similar que en PECE, en las primeras horas de la curva de crecimiento, mientras que en las últimas, el crecimiento de estos fue mejor en PECE; finalmente, el BHI favorece mejor el desarrollo de los S-2 y S-8 que el PECE, ya que lo superó en todo momento.

Además, con la cuenta viable se demostró que las bacterias estaban viables, de las nueve a las diez horas promedio de experimentación se pudieron determinar las UFC/ml, después de este tiempo no se pudieron calcular dado a que hubo un crecimiento masivo en las placas. Por esta razón se realizó un estudio de correlación, utilizando el programa EXCEL de Microsoft Office XP, con el fin de conocer los datos de UFC/ml que se reportaron incontables y saber que medio favorece más satisfactoriamente el desarrollo de cada uno de los serotipos trabajados.

Por último, todos los resultados los presentamos en gráficas, tablas y se muestran algunas imágenes para facilitar su análisis y comprensión.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

1.1.1 Antecedentes

Las primeras observaciones de la enfermedad causada por *App* fueron hechas por Pattinson y cols. en 1957, Pattinson y Matthews en 1961, y Olander en 1963 ⁽¹⁾. Los primeros aislamientos de *App* fueron reportados en el comienzo de los años 60 en Gran Bretaña, California ⁽²⁾; y cerca de La Plata, Argentina, en abril de 1961 en una granja perteneciente a los hermanos O'Grady. ⁽³⁾

En ese tiempo, la bacteria fue propuesta como una de estas tres especies: *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus parahaemolyticus*, o *Haemophilus pleuropneumoniae*. Pero, pruebas bioquímicas del microorganismo como la habilidad de fermentar ciertos azúcares, establecieron que no pertenecía a las especies ya existentes de *H. parainfluenzae* ⁽⁴⁾. Posterior a esto, se le nombraba *H. parahaemolyticus* y *H. pleuropneumoniae* indistintamente. En 1978, Kilian y otros, establecieron que los aislamientos en humanos de *H. parahaemolyticus* son claramente distintos a los del cerdo y deberían ser clasificados en diferentes categorías ⁽⁵⁾. Las bacterias aisladas del cerdo fueron después categorizadas como *H. pleuropneumoniae*, un nombre propuesto originalmente por Shope y cols. en 1964 y por White y cols. en 1964 ^{(1) y (4)}

En 1983, estudios de hibridación de DNA por Pohl y cols, indican que no hay homología entre *H. pleuropneumoniae* y *H. Influenzae*. Este resultado dio el cambio de género de *Haemophilus* a *Actinobacillus* ⁽⁶⁾. El nombre oficial del microorganismo es ahora *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

1.1.2 Características generales y morfológicas

Desde el punto de vista morfológico *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*) es una bacteria que se presenta en el microscopio óptico como pequeños cocobacilos pleomórficos (0.5-1 x 1-2 µm), Gram negativos, fermentativos, hemolíticos, anaeróbico facultativo e inmóvil ^{(7), (8) y (9)}; aunque estudios de Negrete et. al., demuestran que produce un flagelo compuesto de una proteína de 65 kDa, que le proporciona motilidad. ⁽¹⁰⁾ Posee una membrana externa en donde se incluye el LPS y distintos tipos de proteínas de gran interés (proteínas de membrana externa). La cápsula, que se relaciona con la patogénesis, esta compuesta por oligosacáridos repetitivos ⁽⁷⁾. En aislamientos recientes se ha descrito la presencia de fimbrias. ⁽¹⁰⁾ Requiere del factor V (NAD) para crecer. ^{(8) y (11)}

Actinobacillus pleuropneumoniae es muy lábil en el medio ambiente, en el laboratorio no sobrevive más de 8-10 días en caldo a temperatura ambiente (independientemente de la suplementación o no con NAD) y a la temperatura de 4 °C, la supervivencia solo llega a los 18 días. Resulta adecuada para su conservación prolongada la utilización de temperaturas de -80°C en un medio que incluye leche descremada y glicerina, al igual que la liofilización.

Actinobacillus pleuropneumoniae es destruido por la mayoría de los desinfectantes, especialmente los derivados de cloro. ⁽¹²⁾

1.1.3 Taxonomía y clasificación

La clasificación taxonómica de *App*:

- * Familia: Pasteurellaceae, al igual que los géneros *Pasteurella* y *Haemophilus*.
- * Género: *Actinobacillus*.
- * Especie: *pleuropneumoniae*. ⁽⁸⁾ y ⁽¹³⁾

Basados en el requerimiento del factor V, *App* puede ser dividida en:

- * biotipo 1: NAD – dependiente
- * biotipo 2: NAD – independiente. ⁽⁷⁾

A la fecha del biotipo 1 se han descrito 15 serotipos ⁽¹⁵⁾. Donde el serotipo 5 fue dividido en dos subtipos 5a y 5b. ⁽³⁵⁾ La serotipificación es principalmente basada en los polisacáridos capsulares y los lipopolisacáridos de la pared celular. ^{(7), (15) y (16)}

Todos los serotipos de *App* pueden causar severas enfermedades y la muerte en cerdos, hay indicaciones que la fuerza de su virulencia varia. La fuerza de la virulencia parece ser más o menos relacionada al biotipo o serotipo y de acuerdo a esto se agrupan en:

- * Virulentos
- * Menos virulentos

Donde, experimentos y observaciones confiables de la infección proveen evidencias que el biotipo 2 es menos virulento que el 1. También indican que dentro del biotipo 1, el serotipo 1, 5a, 5b, 9 y 10 son más virulentos que el resto de los serotipos de este biotipo. ⁽⁷⁾

1.1.4 Características de crecimiento y cultivo

Actinobacillus pleuropneumoniae crece bien a 37 °C, preferiblemente en presencia de 5 % CO₂, al menos en los cultivos iniciales. En 24 horas o menos, en agar sangre en presencia de la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* Cowan 1, produce colonias redondas, pequeñas (0.5 - 1 mm de diámetro o menos), lisas y brillantes o mates y de aspecto céreo, de color gris blanquecino y olor característico. ^{(1) y (12)}

No se consideran microorganismos muy exigentes, crecen bien en distintos tipos de medios de cultivo; habitualmente se utiliza agar chocolate, medios suplementados con NAD: como agar PPLO (Pleuropneumonia-like organisms), Todd – Hewitt, caldo o agar BHI, Soya - Trypticaseína; además, agar sangre al 5 %, inoculado con una estría de cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, que produce el factor V y permiten observar el fenómeno de Satelitismo ⁽¹²⁾.

1.1.5 Características metabólicas

Actinobacillus pleuropneumoniae posee enzimas que le permiten un metabolismo relativamente activo comparándola con otras bacterias. Todos los serotipos son hemolíticos y producen CAMP positivo, el cual está relacionado con las toxinas APX. La prueba de CAMP se basa en el hecho de que la beta – hemolisina de *Staphylococcus aureus* en un medio de agar con sangre ovina o bovina actúa en forma sinérgica con la cohemolisina que produce *App* ⁽¹⁷⁾.

Además todos los serotipos son ureasa positivos. ^{(1), (17) y (18)} En la **tabla 1** se resumen estos datos:

Requerimiento de factor V	+	Producción de gas a partir de:	
Producción de porfirina a partir del ácido d-aminolevulínico	+	Glucosa	-
Indol	+	Fructosa	+
Ureasa	+	Sacarosa	+
Ornitín descarboxilasa	-	Lactosa	variable
Arginín dihidrolasa	-	Xilosa	+
Hemólisis	+	Ribosa	+
Hemaglutinación	-	Manosa	+
Reacción CAMP	+	Manitol	+
β -galactosidasa (ONPG)	+	Sorbitol	-
α -fucosidasa	-	Arabinosa	-
Catalasa	Variable	Ramnosa	-
Fosfatasa alcalina	+	Galactosa	+
α -galactosidasa	+	Maltosa	+
α -glucosidasa	-	Melibiosa	-
β -glucosidasa	-	Trehalosa	-
α -manosidasa	-	Melicitosa	-
β -xilosidasa	-	Rafinosa	variable
Lisina descarboxilasa	-	Inulina	-
Oxidasa	Variable	Dulcitol	-
Ubiquinona	+	Glicerol	-
Naftoquinona	+	meso-eritritol	-
SH ₂	+	Inositol	-
β -glucuronidasa	-	Xilitol	-
Reducción de nitratos	+	Esculina	-
Reducción de nitritos	+	Salicina	-
Producción de ácido a partir de glucosa	+		

Tabla 1. Determinaciones principales y diferenciación metabólica de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.⁽¹²⁾

Es importante mencionar que los medios elaborados para realizar las pruebas bioquímicas manejadas en la Tabla 1, deben estar suplementados con la formula de enriquecimiento Fildes⁽¹⁹⁾ o con NAD.

1.1.6 Localización

Actinobacillus pleuropneumoniae es considerado un parásito obligado del tracto respiratorio porcino. Puede ser aislado de la cavidad nasal, amígdalas, y pulmones de cerdos infectados.⁽⁷⁾

Además puede ser encontrado en fluido alveolar e interlobular, y puede diseminarse del parénquima a la pleura vía vasos linfáticos y pleura, la bacteremia es rara. In situ la hibridación ha

revelado grandes cantidades de *App* fagocitados por macrófagos alveolares y polimorfonucleares, se ha confirmado que esta bacteria no invade las células epiteliales. ⁽¹⁸⁾

1.1.7 Transmisión

La principal ruta de diseminación de la enfermedad es por vía aérea a través de aerosoles aunque solo en distancias cortas, así como por contacto directo entre animales enfermos y susceptibles. ^{(20) y (21)}

La introducción de la enfermedad en una granja se debe generalmente a la llegada de animales enfermos. Las condiciones concurrentes de cambios climáticos y ventilación deficiente, favorecen su diseminación. ⁽¹²⁾

1.1.8 Factores de virulencia

Diversos factores de virulencia han sido descritos, entre los más importantes se incluyen:

- * Cápsula: es encontrada en todos los serotipos de *App*, la cual posee una composición y estructuras que son inmunológicamente únicas. La estructura química consiste principalmente de oligosacáridos repetitivos y polímeros ácidos unidos por enlaces fosfodiéster. ⁽²²⁾ La cápsula protege a la bacteria contra la fagocitosis y de la lisis del complemento, además es requerida para la virulencia de la bacteria. ^{(7) y (23)} El grado de desarrollo de la cápsula varía según los serotipos (bien definida en: 1, 3 y 5, apenas se identifica en 2 y 7.) ⁽¹²⁾
- * Lipopolisacáridos: son el mayor constituyente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Consisten de un polisacárido y un lípido A, el último es un compuesto tóxico (endotoxina). El polisacárido consiste de un core y una cadena O. Además, el LPS puro de *App* tienen un potencial para causar daño tisular, lesiones inducidas por LPS en pulmones de cerdos se caracterizan por ser no hemorrágicas y no necróticas. El LPS también ha sido implicado en la adhesión de *App* a la mucosa y tracto respiratorio, ^{(7), (24) y (25)} siendo clave en la colonización e incluso también puede representar una alternativa en la captación del hierro, a partir de la hemoglobina. ⁽¹²⁾
- * Proteínas de membrana externa: se ha demostrado que todos los serotipos contienen varias proteínas similares, que incluyen el peptidoglicano asociado a lipoproteína Pal A de 14 kDa, una proteína modificable por calor de 29 a 41 kDa, proteína principal de 32 a 42

KDa que varía dependiendo del serotipo y una proteína de 48 kDa ⁽⁷⁾. 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. ^{(12) y (26)}

- * Proteasas: el papel exacto de estas en la patogénesis de la pleuroneumonía porcina no es clara. Se cree que degradan IgA, lo cual, puede facilitar la diseminación de *App* en mucosas y además, con el rompimiento de la hemoglobina que le serviría como un mecanismo de adquisición de hierro. ⁽⁷⁾
- * Toxinas APX: pertenecen a la familia de las toxinas RTX. Entre los diferentes serotipos de *App* han sido descritas cuatro diferentes exotoxinas (ApxI, ApxII, ApxIII y ApxIV). ^{(8), (29) y (30)} ApxI, II y III son fuertemente hemolíticas y citotóxicas, excepto la ApxIV y juegan un papel importante en la inmunidad protectora contra *App*, especialmente ApxI. ⁽⁸⁾ Se cree que son los factores primarios responsables de las lesiones hemorrágicas características de la pleuroneumonía porcina. ⁽²⁹⁾

	Actividad		PM (kDa)	Serotipos que las producen
	Hemolítica	Citotóxica		
ApxI	Fuerte	Fuerte	105-110	1, 5a, 5b, 9, 10, 11 y 14
ApxII	Débil	Moderada	103-105	todos, excepto el 10 y 14
ApxIII	Ninguna	Fuerte	120	2, 3, 4, 6, 8 y 15
ApxIV*	Débil	ND	200* ¹	Todos

* A diferencia de las demás toxinas, esta es producida in vivo

*¹ El peso molecular es predecido de la secuencia proteica

ND: no determinada

Tabla 2. Toxinas Apx producidas por diferentes serotipos de *App* ^{(18), (27) y (29)}

Entre otros factores podemos mencionar a las fimbrias, a través de las cuales se adhiere a la traquea y al pulmón, por lo que se piensa que pueden desempeñar un papel activo en la colonización ⁽¹²⁾; *App* produce una potente ureasa que tiene participación en la patogénesis ^{(12) y (30)} y superóxidodismutasas que son metaloenzimas implicadas en la defensa celular frente al daño oxidativo. ⁽¹²⁾

1.1.9 Epidemiología

Actinobacillus pleuropneumoniae como ya se había mencionado, causa la enfermedad de PCP, la cual es distribuida en todo el mundo y origina severas pérdidas económicas. ⁽³¹⁾ y ⁽³²⁾

La distribución geográfica de los serotipos de *App* revela que la prevalencia es diferente en varias partes del mundo (**Tabla 3**) Los serotipos 1, 5 y 7 del biotipo 1 prevalecen en Norteamérica. El serotipo 2 ha sido encontrado más comúnmente en Europa y Japón. ⁽¹⁵⁾, ⁽³³⁾ y ⁽³⁴⁾ En Canadá se aíslan más los serotipos 1, 3 y 5. En Escandinava y España el 1, 2 y 9. ⁽³⁵⁾

País	Serotipos prevalentes	Serotipos dominantes
Argentina	1, 2, 3, 5, 12	1
Australia	1, 2, 3, 7, 12	1
Bélgica	2, 3, 6, 7, 8, 9, 11	3
Brasil	1, 3, 4, 5, 7, 9	5, 3
Canadá	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10	1, 3, 5, 7
Chile	1,5	1, 5
Croacia	2, 7, 8, 9	2, 9
Checoslovaquia	1, 2, 7	2
Dinamarca	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10,11,12	2
Francia	2, 3, 7, 8, 9	9
Alemania	2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10	2, 7, 9
Hungría	1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12	2, 3, 7
Italia	1, 2, 3, 4, 5, 7	5
Irlanda	3	3
Japón	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12	1, 2
Corea	2, 3, 5, 7	2, 5
México	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	1, 8
Holanda	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11	2, 9, 11
Noruega	2	2
Polonia	1, 2, 5, 9	1, 9
España	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12	1, 2, 4, 7, 9
Suecia	2, 3, 4	2
Suiza	2, 3, 7, 9	2
Taiwán	1, 2, 3, 5	1, 5
Reino Unido	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10	2, 3, 8
Estados Unidos	1, 3, 5, 7, 8, 9	1, 5
Venezuela	1, 7, 4, 2, 3, 6	1

Tabla 3. Distribución geográfica de los serotipos de *App* en el mundo ⁽⁹⁾

1.1.10 Signos clínicos

La PCP es una enfermedad que afecta el tracto respiratorio del cerdo y se caracteriza porque el animal presenta lesiones pulmonares de carácter hemorrágico, fibrinoso y necrótico, es altamente contagiosa y causa las mayores pérdidas en la industria porcina y por lo tanto tiene un impacto económico mundial. ^{(25), (36), (37) y (38)}

Los signos clínicos varían con la edad de los animales, el estado de inmunidad, las condiciones ambientales y el grado de exposición al agente infeccioso. El curso clínico puede ser:

- * Hiperagudo: se caracteriza por que el animal tiene fiebre hasta de 41.5 °C, está apático y no come. Hay un período corto de diarrea y vómito. Los animales afectados mueren en el piso sin presentar signos respiratorios distinguibles, el pulso cardíaco se incrementa. La piel de la nariz, orejas, patas se observa descamada. La muerte del animal ocurre dentro de las 24 a 36 horas después de desarrollar los signos clínicos.
- * Agudo: los cerdos manifiestan un incremento en la temperatura corporal entre 40.5 y 41 °C, la piel se enrojece, se rehúsan a comer y beber agua. Se mencionan síntomas respiratorios severos con tos, disnea y algunas veces se hace evidente que respiran por la boca.
- * Crónico: se desarrolla después de que desaparecen los signos agudos. Puede haber o no fiebre y tos espontánea e intermitente. Los animales pierden el apetito y consecuentemente disminuyen la ganancia de peso corporal. Los signos clínicos pueden estar exacerbados por otros agentes infecciosos ⁽³⁰⁾.

1.1.11 Lesiones

La pleuroneumonía puede ocurrir en cerdos de todas las edades ⁽³⁸⁾. Estudios de necropsia de cerdos que han sido infectados por *App*, exponen lesiones principalmente en el tracto respiratorio. ⁽³⁹⁾

La neumonía es en su mayoría bilateral y se afectan los lóbulos cardiaco y apical, así como una parte de los lóbulos diafragmáticos donde las lesiones neumónicas son frecuentes, localizadas y bien marcadas. Las áreas dañadas son oscuras y sólidas. La cavidad torácica contiene líquido sanguinolento. En muchos casos crónicos, se desarrollan nódulos de diferentes tamaños principalmente en lóbulos diafragmáticos. Esos nódulos similares a abscesos, están delimitados por una delgada capa de tejido conectivo y se observan algunas áreas de adherencia a la pleura. En algunos casos, las lesiones de los pulmones sanan y solamente se puede observar residuos localizados de la adherencia pleural.

En los estadios tempranos de la enfermedad, los cambios histopatológicos están caracterizados por necrosis, hemorragia, infiltración por neutrófilos, activación de plaquetas y macrófagos, trombosis vascular, edema y exudado fibrinoso. ⁽¹⁾

1.1.12 Diagnóstico

El diagnóstico de la PCP puede llevarse a cabo, al observar signos clínicos que el cerdo desarrolle; pero, pueden ser confundidos con otras enfermedades del tracto respiratorio porcino. Para la diferenciación e identificación de *App* se han utilizado técnicas inmunológicas:

- * Fijación de complemento: fue una de las primeras pruebas usadas para serodiagnosticar *App*. fue descrito por Nicolet en 1971, como un método de diagnóstico de la PCP, rápidamente llegó a ser el estándar para la serotipificación de esta bacteria. Esta prueba fue usada frecuentemente en el pasado, requiere un alto nivel de estandarización y es relativamente insensible al compararlo con otros ensayos como ELISA.
- * Hemaglutinación indirecta: detecta anticuerpos en suero. Ha sido usada por muchos años como un método de detección bacteriana. Es uno de los mejores métodos para identificar serotipos.
- * ELISA: este método fue propuesto primeramente por Nicolet en 1981 como una alternativa a la fijación del complemento. Esta técnica requiere seleccionar y purificar al antígeno. Es más sensible que otros ensayos inmunológicos.
- * Pruebas de aglutinación y coaglutinación: son métodos simples y sencillos para identificar y serotipificar *App*. Existen tres variantes útiles de la aglutinación: la reacción lenta en tubo, la aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol (2-ME), y la rápida en porta ⁽⁴⁰⁾. Dentro de estas técnicas se incluye el NEUMOTESTmr *App* que es en un método rápido que sólo

requiere de pocos mililitros de suero del animal a estudiar. Es una prueba de aglutinación en placa destinada a identificar directamente anticuerpos (de la clase IgG de alta afinidad) capsulares de *App* (serotipos 1 al 12.)⁽⁴¹⁾

- * Aglutinación en látex: esta reportada como una prueba simple y rápida. Ha sido reportada para los serotipos 1, 2, 3, 5 y 9. No ha sido establecida como una herramienta efectiva de diagnóstico.
- * Inmunodifusión: Está basada en el principio de difusión visible en agar del complejo antígeno - anticuerpo. Esta técnica ha sido de gran ayuda para el estudio de antígenos presentes en *App*.
- * Tipificación bioquímica: ha sido propuesta como una alternativa para la serotipificación tradicional, propuesto por Sirois y Higgins en 1991. Se lleva a cabo analizando variaciones fenotípicas y ayuda para identificar la epidemiología asociada a *App*⁽⁴⁰⁾.
- * PCR: es una técnica usada para amplificar regiones específicas del ADN. Los principios de esta técnica fueron descritos primeramente en 1971. Esta técnica se basa en el hecho de que ciertas secuencias de una región dada de la molécula del ADN son conocidas. Además, se puede utilizar para identificar microorganismos causantes de enfermedad y de suma importancia en medicina en donde es necesario un diagnóstico rápido. se ha utilizado y como una herramienta de diagnóstico para detectar ciertos microorganismos específicos en muestras clínicas. El PCR también puede utilizarse para realizar estudios epidemiológicos y llevar a cabo una vigilancia epidemiológica en las granjas animales. Otra importante aportación del PCR es que permite la detección de los animales que son portadores de cierta enfermedad⁽⁴¹⁾.

1.1.13 Tratamiento⁽¹⁾

Generalmente, *App* es susceptible In vitro a la penicilina, ampicilina, cefalosporina, cloranfenicol, colistina, sulfonamida, trimetoprim + sulfametoxazol y gentamicina, esto a una baja MIC. A altas MIC se encuentra estreptomycin, kanamicina, espectinomycin, espiramicina y lincomycin. Los antibióticos que pertenecen a la familia de los beta – lactámicos (penicilina, ampicilina, amoxicilina) normalmente presentan buena actividad contra *App*, pero datos de EU y otros países reportaron un alto número de bacterias aisladas que son resistentes; esta es más frecuente en los serotipos 1, 3, 5 y 7. El antibiótico de primera elección debe ser uno con una MIC baja y que posea propiedades farmacocinéticas satisfactorias.

La terapia con antibióticos es efectiva en animales clínicamente afectados sólo en la fase inicial de la enfermedad, cuando se puede reducir la mortalidad. Los antibióticos son administrados parenteralmente (subcutáneo o intramuscular) y en altas dosis. Para asegurar la efectividad y alcanzar niveles adecuados del antibiótico en sangre, es necesario administrar el fármaco repetidas veces, tomando en cuenta las propiedades farmacocinéticas. El éxito de la terapia depende principalmente de una detección temprana de los signos clínicos y de una intervención terapéutica a tiempo.

A pesar de que se alcance un éxito clínico, se debe recordar que la terapia con antibióticos no elimina la infección; ya que en pulmón o en las amígdalas del cerdo se desarrollan abscesos, lo que ocasiona que estos sean una importante fuente de infección para otros animales. Los que están muy afectados y que no se recuperan con tratamiento deben ser sacrificados.

1.1.14 Prevención y control ⁽¹⁾ y ⁽¹²⁾

Para determinar la estrategia de control, es necesario tomar en consideración las características epidemiológicas de la Pleuroneumonía. Algunas alternativas a considerar para tratar de reducir el riesgo de infección son: el control de los factores ambientales, un sistema de producción con unidades de crianza, engorda, y utilizar el sistema de todo dentro – todo fuera y el tratamiento con diferentes tipos de antibióticos.

Para evitar la diseminación de la PCP, en una granja se pueden tomar las siguientes medidas:

Control de factores ambientales:

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

Manejo de los animales:

- * Suministrar abundante agua.
- * No mezclar animales de diferentes procedencias ni edades, ni portadores y no portadores (determinados; serológicamente y/o bacteriológicamente).
- * Utilizar el sistema todo dentro - todo fuera de forma estricta.

Si el cerdo ya esta contagiado:

- * Realizar medicaciones estratégicas con antibióticos antes y después de la época normal de expresión clínica. Considerar las medicaciones estratégicas como rutina dentro de los primeros 8 días después de introducir los animales en el engorde.
- * Considerar la vacunación de cerdas reproductoras y engorde durante una primera fase de dos años cuando una explotación se contamine por primera vez.

Vacuna contra la PCP (bacterina):

La vacunación es una de las más importantes estrategias para prevenir y controlar esta enfermedad. Actualmente, las vacunas disponibles para *App* son bacterinas inactivadas, las cuales pueden generalmente reducir los síntomas clínicos y la mortalidad causada por la infección, pero frecuentemente falla para prevenir la infección crónica y lesiones pulmonares. En contraste, la infección natural y experimental puede inhibir la colonización de algunos serotipos, esto sugiere que la vacuna atenuada puede ser una estrategia viable para prevenir la infección causada por *App*.⁽⁸⁾

Hasta la fecha se ha utilizado contra la pleuroneumonía porcina, bacterinas o vacunas de subunidades, las cuales están basadas en varios componentes de *App*. Los resultados obtenidos con la bacterina, han ofrecido, protección homologa contra el serotipo usado para preparar el material de la vacuna. En contraste, una infección natural de cerdos con algún otro serotipo sirve para prevenir la reinfección natural. Se piensa que las toxinas *Apx* son de particular importancia para la inducción de una inmunidad protectora, las bacterinas que no las contienen no aportan una protección adecuada.⁽³⁶⁾

1.2 ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET), pertenecen a un amplio grupo de enfermedades neurodegenerativas en animales y en el hombre, siendo la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) la que actualmente; gran cantidad de ganaderos, investigadores, secretarías gubernamentales y organizaciones internacionales tienen en la mira y es monitoreada a nivel mundial; ya que en los últimos 20 años ha tomado una gran importancia. Esto se debe a que se comportan de manera silenciosa y su agente etiológico dado a sus características puede ser infectivo de diversas formas. Las pérdidas económicas que han afectado severamente los mercados y las relaciones internacionales incluyendo a importantes sectores: ganadero (ovinos y

bovinos), la investigación en la restricción al comercio de productos biológicos para propósitos de la misma (suero fetal bovino, medios de crecimiento bacteriano, ingredientes en cosméticos y alimentos para mascotas, entre otros), que principalmente están suplementados con órganos y secreciones de origen bovino que pueden provenir de los países con focos de infección, tales como: Inglaterra, Irlanda, Francia, España, Suiza entre otros. Además, de las importaciones de rumiantes vivos y de productos de estos, con el fin de prevenir la entrada de la EEB.

Las EET están relacionadas clínica y anatomopatológicamente y reciben la denominación de espongiiformes por el tipo de lesión que se produce en el Sistema Nervioso Central (SNC).⁽⁴³⁾ Desde el punto de vista macroscópico los cerebros de los animales infectados aparecen normales, mientras que microscópicamente los cambios más notorios consisten en astrogliosis, vacuolización intracelular con aspecto característico de esponja, pérdida de neuronas y formación de placas amiloides ocasionales.⁽⁴³⁾ Son transmisibles, con largos períodos de incubación (meses a años), con cursos progresivos casi siempre fatales, además que no se presenta una respuesta inmune en el hospedero.

Estos padecimientos en un principio se especularon que eran causados por un virus lento no identificado con características especiales.

Esta epizootia se inició en la Gran Bretaña (GB), a partir de noviembre de 1986; aunque estudios retrospectivos señalaron que los primeros casos clínicos se presentaron desde abril de 1985. Se observó que se parecía mucho al Scrapie.

Aunque la alarma saltó en un principio en la GB, cuando se decidió estimular la engorda de los bovinos mediante suplementos proteínicos vegetales. Más tarde llegaron los suplementos de animales como las harinas de carne y hueso (HCH) y la utilización masiva de hormonas y de todo tipo de productos.

Otro hecho posible en los casos de EEB en la GB se debe a que el consumidor demanda animales mayores de edad.

Además, se considera que durante los años '70 y principios de los '80 se cambiaron los procedimientos de fusión y extracción por solventes. Dichos cambios en el procesamiento fueron adoptados por la caída del precio del sebo parte rica en grasas del proceso cuyo rendimiento aumenta al usar solventes, el incremento del costo de la energía debido a la crisis del petróleo y la necesidad de utilizar sistemas más seguros en reemplazo de los solventes potencialmente explosivos y carcinogénicos.

Otra teoría acerca del origen de la EEB, es obra de dos investigadores Británicos, estos científicos, sitúan el origen de la contaminación en India y Bangladesh, países que exportaron cientos de miles de toneladas de restos animales a la GB para fabricar abonos y harinas. Ellos sostienen que el empleo de restos humanos en estas harinas enviadas originó la enfermedad degenerativa en el ganado vacuno y luego en el hombre. ⁽⁴⁴⁾

El ganado bovino positivo a EEB ha variado entre los 20 meses y 19 años de edad, aunque la mayoría de casos ocurre entre los 4 y 6 años de edad. No se ha encontrado una predisposición genética o de raza. La mayoría de casos de EEB han provenido de ganado lechero debido, probablemente, a las diferencias con los sistemas de alimentación del ganado de carne. Más aún, el ganado de carne es generalmente joven al momento del sacrificio debido a que el período de incubación promedio es de 4 a 6 años, por lo que el ganado de carne infectado no vivirá lo suficiente para poder desarrollar los signos clínicos.

La principal vía de transmisión es la ingestión de alimentos contaminados con EEB, los cuales son, en su mayoría, suplementos alimenticios proteicos. La inoculación intracerebral, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intraespinal y subcutánea de tejido cerebral contaminado con EEB transmite la enfermedad a especies receptivas. No existe evidencia experimental ni epidemiológica de transmisión horizontal de EEB. Aún existe controversia con respecto al potencial de transmisión vertical. Algunos casos de EEB en la progenie también fueron infectados en la GB y un estudio en ganado bovino de la GB concluyó que la transmisión vertical no puede ser descartada. Sin embargo, la conclusión con respecto al papel de la variación en la susceptibilidad genética u otros mecanismos es poco clara y ninguno de los casos de EEB en la progenie ha sido reportado con EEB fuera de la GB. Si se diese un cierto número de casos de transmisión maternal, éstos no serían suficientes para mantener la epidemia, ni siquiera en la GB (verse en la **Tabla 4 y Figura 1.**) La leche, semen, embriones y óvulos no son infecciosos. ⁽⁴⁵⁾

Cronología de los eventos básicos de la EEB	
✓	1986. Primer caso diagnosticado en bovinos en la GB.
✓	1989. Primeros casos importados en islas Malvinas y Omán.
✓	1989. Primer caso nativo en Irlanda.
✓	1990. Primer caso nativo en el Continente Europeo (Suiza).
✓	2001. Primer caso nativo en bovinos en Japón.
✓	2003. Primer caso nativo en bovinos en Canadá.
✓	2003. Primer caso en EE.UU. en bovinos importados.
✓	2005. Primer caso nativo en bovinos en EE.UU.

Tabla 4. Cronología de los eventos básicos de la EEB a nivel mundial

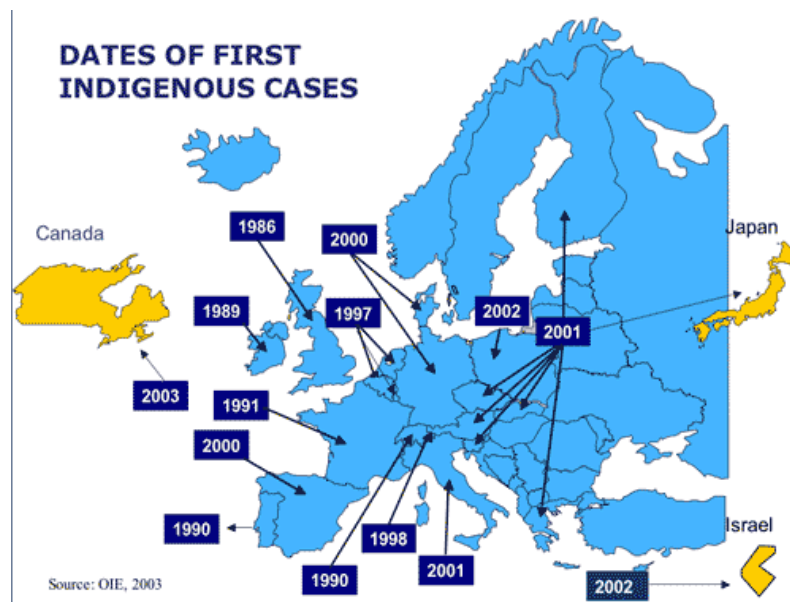


Figura 1. EEB: Datos de los primeros casos nativos

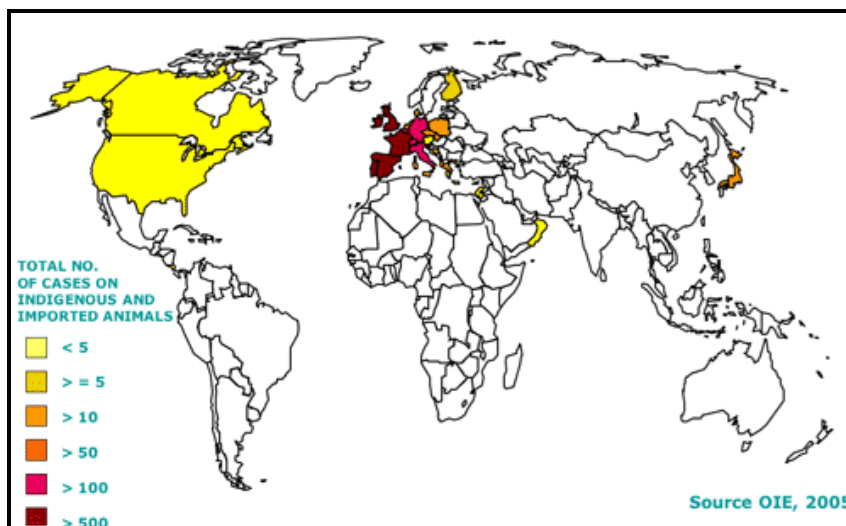


Figura 2. Mapa de Distribución Geográfica [OIE] ⁽⁴⁵⁾

A inicios de la década de 1990 se llevaron a cabo estudios de infectividad de EEB en el ganado (verse en la **Figura 2.**) Al mismo tiempo, la inoculación experimental de tejidos infectados con EEB en ratones solo identificó infectividad en el tejido cerebral. Por lo tanto, la definición de los Materiales Específicos de Riesgo (MER; aquellos tejidos que se piensa que son potencialmente infectivos) se basó en estudios de infectividad para Scrapie. ⁽⁴⁶⁾

En contraste con muchos casos presentados por los medios de comunicación, los bovinos con EEB tiende a presentar signos sutiles de la enfermedad. Los signos son progresivos, variables en tipo y severidad y pueden incluir depresión, comportamiento anormal, pérdida de peso, sensibilidad frente a estímulos (luz, sonido, tacto) y pasos o movimientos anormales. Otros signos que han sido notados en casos de EEB incluyen disminución en la producción de leche,

bradicardia y contracciones ruminales reducidas. Ninguno de estos signos es específico (patognomónico) para la enfermedad. Sin embargo, con mayor experiencia, los granjeros y veterinarios pueden convertirse en detectores eficientes para la identificación de casos sospechosos de EEB. ⁽⁴⁷⁾ Los objetivos más importantes de los programas de prevención y control de la EEB son reducir el riesgo de exposición de los animales y humanos al agente. Por lo tanto, se deben considerar dos niveles de medidas: Aquellas que bloquean el ciclo de ampliación en la cadena alimenticia y aquellas que previenen que el material infeccioso ingrese a los alimentos humanos.

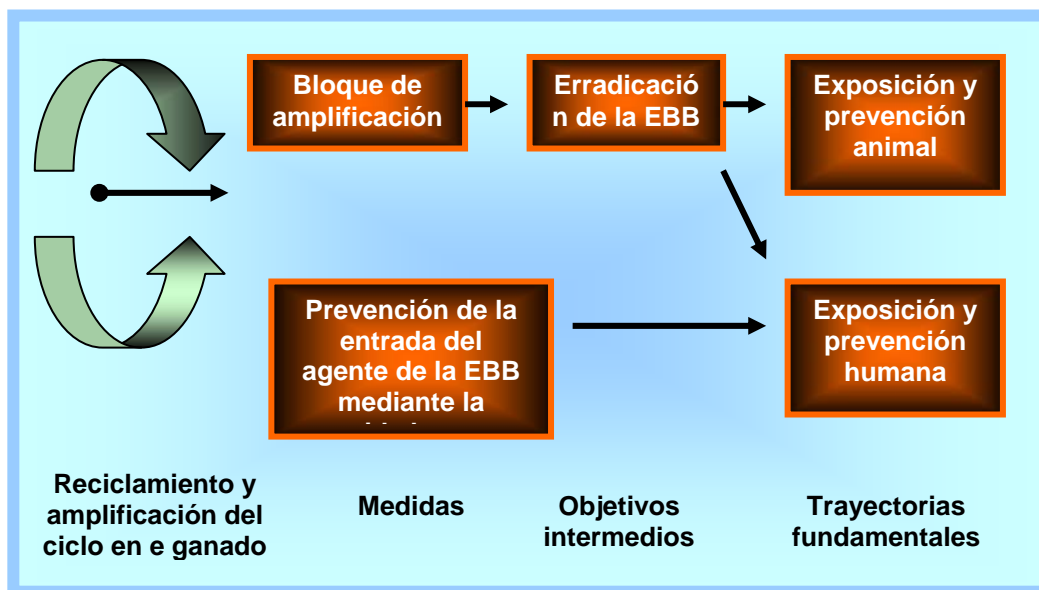


Figura 3. Reduciendo el riesgo de exposición a EEB en bovinos ganado y humanos ⁽⁴⁹⁾.

Debido al prolongado período de incubación, el tiempo transcurrido entre una efectiva implementación de medidas y la disminución detectable en el número de casos de EEB podría ser mayor a 5 años, antes que el efecto de las medidas pueda ser observado. Este intervalo podría aumentar si las medidas no son impuestas efectivamente, tal como usualmente ocurre durante algún tiempo después de su implementación.

De manera general, la gestión de riesgos para la EEB en Europa no está concertada. Los Estados Miembros de la (UE) cuentan con reglas comunes para la implementación de medidas y algunos países con deseos de incorporarse a la mencionada están adaptando sus precauciones en conformidad. Sin embargo, la implementación de estas aún varía de un país a otro y son las siguientes: Prevenir la exposición de humanos ⁽⁴⁹⁾ y evitar la contaminación cruzada de carne con MER ⁽⁵⁰⁾. Las cautelas para proteger la sanidad animal son: Prohibición de piensos, Parámetros para Rendering y Materiales específicos de riesgo (MER). Con la categorización por riesgo de EEB se persigue establecer normas para el comercio para cada categoría de riesgo, lo que aportará las necesarias garantías para la protección de la salud pública y la salud animal en los países importadores. Las condiciones para los intercambios comerciales están ya fijadas en las actuales

recomendaciones del Código sanitario para los animales terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal OIE (2005).

La OIE comenzó hace dos años un proceso para revisar y simplificar la clasificación de países en función de su riesgo de EEB en tres categorías.

Categoría 1:	Países con un riesgo de EEB insignificante y un programa de vigilancia activa reducido que detectan una prevalencia prevista de 1 por 50.000 importaciones autorizadas sin restricciones.
Categoría 2:	Países con un riesgo de EEB controlado y un programa de vigilancia activa que detecta un prevalencia prevista de 1 por 100.000 importaciones autorizadas tras la eliminación de los MER.
Categoría 3:	Países con riesgo indeterminado de EEB. Estos países sólo podrán exportar una lista limitada de productos comercializables.

Tabla 5. Finalmente en la 73ª sesión del 24 de mayo de 2005 se alcanzó un acuerdo sobre el procedimiento simplificado de categorización y sobre las normas de vigilancia. ^{(51), (52) y (53)}

Anualmente, durante la Sesión General en el mes de mayo de 2005, el Comité Internacional, compuesto por los Delegados de los Países Miembros de la OIE, adopta mediante resolución una lista de países clasificados según su categoría de Riesgo de EEB.

La evaluación del estatus de un país respecto a la EEB debe ser solicitada a la OIE por los Países Miembros, para que sean clasificados en una de las 3 categorías frente a la presencia de riesgo de EEB en sus territorios. Esta categoría se obtiene únicamente por aprobación de los Países Miembros de la OIE durante la sesión anual. Por iniciativa de la Comisión, el Comité Director Científico (CDC) de la UE, realizó una evaluación del riesgo geográfico (GBR) en lo que se refiere a la EEB en los Estados miembros de la UE y en los países tercermundistas.

Nivel I:	País en donde la EEB es muy improbable;
Nivel II:	País en donde la EEB es improbable pero no está descartada;
Nivel III:	País en donde la EEB es probable pero no está confirmada, o confirmada pero a pequeña escala;
Nivel IV:	País en donde la EEB está confirmada a gran escala.

Tabla 6. A partir de las evaluaciones geográficas de los riesgos, el CDC clasifica a los países en cuatro categorías ^{(52) y (53)}

El CDC evalúa constantemente la situación de los países tercermundistas en materia de riesgo geográfico de EEB como si se tratara de Estados miembros de la UE. El riesgo geográfico de EEB es el único factor determinante que permite decidir el nivel de protección necesario.

El objetivo que se persigue con la categorización por riesgo de EEB es establecer normas para el comercio para cada categoría de riesgo, lo que aportará las necesarias garantías para la protección de la salud pública y la salud animal en los países importadores. Las condiciones para los intercambios comerciales están ya fijadas en las actuales recomendaciones del Código sanitario para los animales terrestres de la (OIE).

Dado este potencial peligro obviamente es importante tomar medidas estrictas en el control de la EEB en bovinos y también la contaminación de alimentos para humanos con el agente infeccioso. Aquí es importante hacer un alto y pensar sobre la posibilidad de que esta enfermedad afecte a un país pobre. La GB ha tenido y tiene el poder económico para controlar el problema y disminuir los riesgos en salud pública de la EEB. Al parecer se ha identificado que el factor de mayor riesgo en la difusión de la enfermedad es el de alimentar a los bovinos con HCH, una práctica comúnmente utilizada en la mayoría de los países del mundo. ⁽⁵⁴⁾

Los costos primordiales que se manejan para un país con riesgo de contagio o que lo presenta son impactos a nivel de: Cambios en la forma de producción, en Salud Pública, en procesamiento y comercialización de productos pecuarios, a nivel de vigilancia y a nivel de comercio. ^{(55) y (56)}

Los costos mas importantes en este momento para los países dentro de América Latina, que quieren exportar a países desarrollados, son la necesidad de implementar nuevos sistemas de: Procesamiento de los bovinos en los mataderos; Vigilancia que pueda identificar individualmente a los animales. Un riesgo que estos países exportadores no pueden controlar es la disminución en la demanda internacional con cada mala noticia sobre la EEB.

Con respecto a todos los países en la región los riesgos del uso de HCH en la elaboración de alimentos para los animales parecen altos, y su impacto económico es potencialmente grande.

Por lo tanto las recomendaciones son: Que los países exportadores utilicen sus sistemas de vigilancia para mostrar al mundo que sus productos son sanos y seguros, libres de enfermedades zoonóticas. De esta manera pueden garantizar su mercado, en términos de precios y consumidores. Y que todos los países tomen acciones para evitar que los alimentos para los bovinos no estén elaborados ni contaminados con HCH. ⁽⁵⁷⁾

Si bien este problema ha tenido en jaque a las grandes empresas dedicadas a la salud, ya que cualquier biológico que comercializan y estén suplementados en el proceso de su

elaboración, con órganos y secreciones de origen bovino están expuestos a tener problemas de salud, social y económicos en los países que exportan.

Tal es el caso de las vacunas, las cuales; su riesgo es relativamente simple de calcular y será variable en función de la modalidad de fabricación.

En el caso de las vacunas bacterianas, normalmente se puede calcular la dilución para evaluar cuántos inóculos pueden estar presentes en la recolección final. Las vacunas virales, la cantidad de material original que dependerá de la dilución frente a adsorción seguida de eliminación del material original por lavado.

Para la mayoría de las vacunas, los factores de dilución son probablemente altos y el nivel de infección que puede estar presente en los inóculos es bajo. Esto dará lugar con frecuencia a cantidades extremadamente reducidas del efecto potencial que pueda subsistir en el producto final. No obstante, mientras no se determinen las dosis infecciosas para cada EET, no se podrá obviar completamente el riesgo residual. Por otra parte, en el caso de las vacunas, existe al menos un peligro teórico, ya que se suelen administrar más de una vez al mismo animal.

La transmisión de una EET debido a la presencia de inóculos residuales contaminados en la vacuna final dependerá principalmente de la especie a la que se administra y la vía de administración. La especie de origen que este expuesta deberá evaluarse en relación con la receptora de la vacuna y la consiguiente presencia o ausencia de barreras entre especies a la infección.

La eficacia relativa de la vía de transmisión, clasificadas por orden decreciente son: intracerebral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea/intradérmica y oral/intragástrica. La eficacia por vía intramuscular se considera similar a la de la vía intraperitoneal.

El riesgo de transmisión también está en relación con la dosis administrada pero, en relación con otros factores que intervienen, no parece ser un factor importante en la evaluación general del riesgo.⁽⁵⁸⁾

Con lo anteriormente citado cualquier vacuna aún con un inóculo bajo es un medio de infección, que puede ser punto de partida para presentar nuevos brotes en países exentos de EET.

1.3 PRIONES

Los priones son promotores contagiosos que consisten únicamente de una proteína, carente de genoma y ácidos nucleicos (replicación sin genes), resistentes a la inactivación por procedimientos comunes de laboratorio.⁽⁵⁹⁾ La palabra en sí se deriva de "proteinaceous infectious particle", definición propuesta por Stanley B. Prusiner.⁽⁶⁰⁾

Se han observado estas proteínas de membrana plasmática como propias de las células normales, y existe en la mayoría de estas, aunque predominantemente en las del SNC.

Se presentan dos isoformas: una forma celular o PrP^c de 33-35 kDa y otra patógena PrP^{Sc} o Scrapie PrP de 33-35 kDa.⁽⁶¹⁾ La proteína PrP^c está constituida por cuatro regiones de estructura secundaria llamadas H1, H2, H3 y H4, en estas regiones se identifican tres zonas de hélice- α llamadas A, B y C, y dos de hoja- β , llamadas S1 y S2.⁽⁶²⁾

Ambas son de la misma proteína, es decir, comparten la misma secuencia de aminoácidos (estructura primaria); se comprobó la imposibilidad de que estas fueran productos de dos tipos de ARNm distintos. La diferencia reside en su estructura secundaria y terciaria, es decir, en su conformación espacial. La forma PrP^{Sc} ha sufrido un plegamiento respecto a la forma celular PrP^c.

Las causas que provocan el error en el plegamiento de la PrP^c definen las formas descritas de las enfermedades producidas por priones y estas son: Formas Esporádicas, Formas Infecciosas y Formas Hereditarias.⁽⁷⁾ El plegamiento de las formas nativas está inducido por partículas PrP^{Sc} infecciosas que ponen en marcha una reacción en cadena, de forma que la infección se desarrolla exponencialmente, tal es el caso de la proteína X, que es un pequeño ligando detectado mediante estudios genéticos y moleculares, que se une al PrP^c y facilita su transformación a PrP^{Sc}.⁽⁶³⁾

La isoforma normal ha sido encontrada en tejidos de mamíferos, entre ellos: ovinos, bovinos, hámster, ratón y en seres humanos, con un 80 – 90 % de homología entre las secuencias de PrP^c en las diferentes especies.⁽⁶⁴⁾ La proteína del prion (PrP^c) es codificada por el DNA cromosómico del huésped; es una glucoproteína con peso molecular de 33 000 a 35 000 y cuenta con un alto contenido de la estructura secundaria α helicoidal sensible a las proteasas y soluble en detergente. La PrP^c se expresa en la superficie de neuronas a través de un anclaje de glucosilfosfatidil inositol, en cerebros infectados como en los no infectados. La isoforma anormal es el único componente conocido del prion y se ha relacionado con su transmisibilidad; esta isoforma

difiere físicamente de la primera por su gran contenido de hojas plegadas, insolubilidad en detergentes, tendencia a agregarse y su relativa resistencia a la proteólisis. ⁽⁶⁵⁾ Se han realizado multitud de experimentos para demostrar la naturaleza de los priones:

Propiedades Físicas y Químicas	Propiedades Biológicas
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Filtrable con poros 25 nm o 100 nm. ➤ Es invisibles al microscopio óptico y electrónico. ➤ Resistente a: Formaldehído y EDTA. ➤ Proteasas (Tripsina, pepsina), Autoclave >134 °C, 18 minutos, Hipoclorito sódico (20°C, 1hora), Hidróxido sódico 2N, Fenol 90%, Éter, Acetona, Permanganato potásico 0.002 M, Urea 6 M, 2 – Cloroetanol y Cloroformo aunque reducen la infectividad. ➤ Nucleasas (ribonucleasas A y III, desoxiribonucleasa I). ➤ Radiación ultravioleta (2540 Å). ➤ Radiación ionizante. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Carecen de cuerpos de inclusión. ➤ Presencia de ácido nucleico no demostrada. ➤ El único componente conocido es la proteína PrP. ➤ Pueden existir en múltiples formas moleculares. ➤ Periodo de adaptación a nuevos hospedadores. ➤ Control genético de la susceptibilidad de algunas especies. ➤ Existencia de distintas cepas.

Tabla 7. Propiedades físicas, químicas y biológicas de los priones ⁽⁶⁰⁾ y ⁽⁶⁶⁾

La función de la forma celular del prion es hoy aun desconocida, aunque se estipulan varias: Al ser capaz de unir Cu^{2+} específicamente se le ha asignado un papel activo en la homeostasis de este catión implicado en procesos de oxido reducción; también se dice que actúa como superóxido dismutasa. ⁽⁶⁷⁾; además de proteína de transducción de señal. ⁽⁶⁸⁾; en la adhesión celular y regulación-distribución de los receptores de acetilcolina.

Existen dos modelos que consideran la infectividad como autopropagación de la forma PrP^{Sc} que incluye una etapa controlada cinéticamente: el Modelo de desnaturalización-renaturalización catalizada y el Modelo de polimerización nucleada por condensación no covalente. ⁽⁶⁹⁾

Los signos clínicos y la patología que producen los priones varían según la especie y animal afectado. Son de desarrollo muy lento, el tiempo de incubación es en extremo largo de entre 2 y 10 años, con ausencia total de síntomas.

En general, en los animales se pueden distinguir dos fases: La Fase Psíquica, en la cual se producen cambios en el comportamiento y el temperamento. La Fase Orgánica, donde se observan alteraciones motoras graves. De igual forma, estas EET pueden transmitirse entre individuos de la misma especie e incluso al hombre. La posibilidad de transmisión de priones entre distintas especies ha permitido definir el concepto de barrera interespecífica. Teniendo como vías de infección: Inyección de hormona de crecimiento humana, trasplantes de córnea, implantación de electrodos intracerebrales, procedimientos quirúrgicos dentales, transfusión de sangre, ingestión de alimentos contaminados y administración de productos contaminados. ⁽⁴⁵⁾

Entre las encefalopatías que afectan, tanto a animales como a humanos; en ambos casos se cita a continuación las más importantes en la actualidad.

Nombre de la Enfermedad	Huésped Natural	Agente	Abreviatura de PrP patogénica	Abreviatura de PrP normal	Distribución	Fecha
Scrapie	Oveja y Cabra	Scrapie	ShePrP ^{Sc}	ShePrPSc ⁿ	Muy extendida	1936
Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV)	Visón	Prion ETV	MkPrP ^{Sc}	MkPrPTME	Norteamérica, Europa	1965
Caquexia Crónica del Ciervo (CWD)	Ciervo Mula y Alce	Prion CWD	MDePrP ^{Sc}	MDePrPCWD	Norteamérica	1967
Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Bovino	Prion EEB	BovPrP ^{Sc}	BovPrPBSE	Reino Unido, Francia, Suiza, Portugal, república de Irlanda	1986
Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF)	Gato	Prion EEF	FePrP ^{Sc}	FePrPFSE	Islas Británicas, Noruega	1990
Encefalopatía de ungulados Exóticos (EUE)	Antílope	Prion EUE	NyaPrP ^{Sc}	NyaPrPEUE	Reino Unido	1996
Kurú	Hombre	Prion Kurú	HuPrP ^{Sc}	HuPrPKu	Papua Nueva Guinea	1966
Enfermedad de Creutzfeldt Jacob	Hombre	Prion CJD	HuPrP ^{Sc}	HuPrPCJD	Mundial	1968
Síndrome de Gerstmann - Straussler-Scheinker (GSS)	Hombre	Prion GSS	HuPrP ^{Sc}	HuPrPGSS	Mundial	1923
Insomnio familiar fatal (FFI)	Hombre	Prion FFI	HuPrP ^{Sc}	HuPrPFFI	Mundial	1986

Tabla 8. Enumeran las enfermedades prion conocidas hasta ahora y alguna información nomenclatural referente a ellas. * Encefalopatías Espongiformes reconocidas por la OIE.

El diagnóstico de las enfermedades prionicas presenta una serie de problemas debidos a las peculiaridades de este tipo de enfermedades. Por un lado estos agentes no inducen respuesta inmune que permita detectar anticuerpos específicos en suero. Por otra parte, la ausencia de un ácido nucleico asociado a la partícula infecciosa impide el uso de herramientas como la PCR.

Estas limitaciones obligan a basar el diagnóstico en la detección de:

- ★ Alteraciones histopatológicas producidas por la enfermedad.
- ★ Isoforma infectiva de la proteína del prion (PrP^{Sc}).
- ★ Infectividad mediante bioensayos apropiados.

Otros problemas adicionales son los tiempos de incubación, extremadamente largos, que la PrP^{sc} solo se acumula en cerebro y que su detección, únicamente es posible tras la manifestación de la sintomatología y signología clínica.

Métodos de diagnóstico

- ★ Síntomas y Signos Clínicos.
- ★ Histopatología.
- ★ Detección de PrP^{sc}
- ★ Inmunohistoquímica.
- ★ Detección de SAF.
- ★ Western Blot.
- ★ ELISA.
- ★ Transmisión a animales.
- ★ Animales Transgénicos.

La presencia de EEB en los países de la Unión Europea (UE) y su posterior diseminación fuera del Continente produjo una reacción a escala mundial por sus potenciales implicancias sobre los seres humanos, alertando a las autoridades de Salud Pública y Sanidad Animal, a tomar todas las precauciones necesarias para proteger a la población humana y animal.

1.4 MEDIOS DE CULTIVO PARA *App*

1.4.1 Todd – Hewitt

El caldo de Todd – Hewitt fue originalmente desarrollado para la producción de hemolisina estreptocócica. El caldo modificado por Updyke y Nikle se emplea de preferencia para el cultivo de estreptococos beta – hemolíticos, especialmente para estudios de tipificación sexológica. Su formulación está constituida por infusión de músculo cardíaco, peptona, dextrosa, cloruro de sodio, fosfato disódico y carbonato de sodio. Si se le agrega NAD al medio, puede utilizarse para el desarrollo de *App*. También puede ser preparado en forma de agar, agregándole de 13 a 15 gramos de este por litro de medio ⁽⁷⁰⁾.

1.4.2 Soya – Trypticaseína

El Agar Soya Trypticaseína es un medio utilizado para promover el crecimiento de microorganismos fastidiosos y adicionado de sangre para observar reacciones hemolíticas. Provee un excelente soporte de crecimiento para organismos aerobios y anaerobios, según lo demostró Leavitt en 1955. Este medio es recomendado en los procedimientos microbiológicos de control de aguas, cosméticos y en la industria farmacéutica. Clínicamente se utiliza para diferenciar especies de *Haemophilus* y *Actinobacillus* debido a que no contiene los factores X y V requeridos para su crecimiento. Así mismo este medio puede ser utilizado como base para preparar medios suplementados como el Agar Sangre y Agar Gelosa Chocolate.

En este medio las peptonas proveen la fuente de nitrógeno y minerales. El azúcar de la Peptona de Soya provee la fuente de carbohidratos. El Cloruro de Sodio tiene su función en el balance osmótico y el Agar es incorporado como agente solidificante ⁽⁷⁰⁾.

1.4.3 Agar Sangre

Es uno de los medios más comúnmente usados en el laboratorio microbiológico. Es adecuado para aislar y cultivar diversos microorganismos de difícil crecimiento ⁽¹⁹⁾. Es un medio enriquecido al que se le adiciona sangre de cordero defibrinada al 5 o 10 % y esta formulado especialmente para la diferenciación de cepas por la hemólisis producida por sus colonias ⁽⁷¹⁾. La formulación de este medio consta de: infusión de músculo cardíaco, peptona de carne, agar y cloruro de sodio ⁽⁷⁰⁾.

Es un medio adecuado para hacer crecer a *App*, siempre y cuando se utilice con una estría nodriza de especies productoras de factor V, con las que satelitizan, como es el caso de *Staphylococcus aureus* ⁽¹⁹⁾.

1.4.4 Agar Chocolate

El agar chocolate posiblemente es la fórmula de uso más frecuente para el cultivo de *App*. Se utiliza para su primo aislamiento ⁽¹⁹⁾. Este medio es básicamente el mismo que el agar sangre, pero con la adición de la sangre a la base mientras esta última está aún a 80°C, las proteínas se precipitarán, los glóbulos rojos se lisarán y la hemoglobina se degradará, haciendo con ello a estos nutrientes, entre ellos el NAD, más fácilmente accesibles para el crecimiento de *App*. Como es natural el medio habrá perdido su capacidad para demostrar las propiedades hemolíticas de los microorganismos ⁽⁷¹⁾.

1.4.5 Medio Pleuroneumonía-like organisms PPLO

Este medio es utilizado para el aislamiento y cultivo principalmente de *Mycoplasma*, es usado ya sea en caldo o agar que fue descrito por Morton, Smith y Lieberman; mientras, que la fórmula del caldo la definió Morton y Lecci. Dicha formulación está constituida por: extracto de carne, extracto de levadura, peptonas que son las fuentes de nitrógeno, vitaminas, aminoácidos y carbono; además, del cloruro de sodio que mantiene el balance osmótico del medio ⁽⁷²⁾.

Además este medio, también se utiliza para hacer crecer a *App*, siempre y cuando este suplementado con el factor V o NAD.

1.4.6 Infusión Cerebro – Corazón

El BHI fue diseñado por Rosenow en 1919 y fue preparado adicionándole piezas de tejido de cerebro a un medio que contenía dextrosa. ⁽⁷³⁾ Es de color amarillo paja, que tiene un alto contenido nutritivo, adecuado para el cultivo de varios microorganismos delicados, difíciles y exigentes; entre los que se encuentran, diversos tipos de bacterias, hongos y levaduras. ⁽¹⁴⁾ Se puede utilizar en forma sólida (agar) y líquida (caldo.) ⁽⁷⁴⁾

Estreptococos, Meningococos y Pneumococos entre otras bacterias, crecen bien en este medio. Si se le añade al agar BHI 10 % de sangre desfibrinada se puede emplear para el aislamiento de *Histoplasma capsulatum*. Con la adición de antibióticos el medio puede emplearse también para otros géneros de hongos. El caldo BHI es muy recomendable para hemocultivos ⁽⁷⁰⁾.

Entre los componentes del medio BHI (BD[®] Bioxon) se encuentra el tejido de cerebro y corazón, peptonas que proporcionan proteínas y otros componentes necesarios para el crecimiento de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y el Disodio hidrógenofosfato actúa como buffer. La D (+) glucosa es el recurso de energía ⁽⁷³⁾.

Composición (g / L)	
Infusión de cerebro	12.5
Infusión de corazón	5.0
Proteosa peptona	10.0
D (+) glucosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Disodio hidrógenofosfato	2.5
pH del medio listo para usarse a 22 °C 7.4 ± 0.2	

Tabla 9. Formulación del medio BHI

El caldo BHI es utilizado también para identificar, aislar y realizar los cultivos de *App* necesarios para la elaboración de las bacterinas que previene la PCP en cerdos. Además la mayoría de los investigadores del mundo lo utilizan para lograr el crecimiento de esta bacteria en sus experimentos.

1.4.7 Medio PECE

Este medio de cultivo su nombre parte de las iniciales de sus primeros cuatro componentes, es líquido, que al ser preparado adquiere un color similar a la canela, consta de seis componentes:

Componentes	g / L
Proteosa peptona	10
Extracto de carne.	20
Caseína	2.5
Extracto de levadura.	5
Cloruro de sodio	5
Disodio hidrógenofosfato	3
	ml / L
NAD al 0.5 %	2
Glucosa al 20 %	2.5

Tabla 10. Formulación del medio PECE.

Hay que recalcar que los componentes de BHI y este medio son muy similares, la diferencia entre ellos y la más importante es que PECE carece de la infusión cerebro – corazón, la cual fue sustituida por peptonas y extractos de levadura y carne. En este trabajo se probará si favorece el crecimiento de los serotipos 1 – 10 de *App* y conocer si puede ser considerado como una opción que proporcione resultados satisfactorios en la elaboración de las bacterinas contra la PCP como lo hace en BHI.

1.5 CURVA DE CRECIMIENTO ⁽⁷⁵⁾ y ⁽⁷⁶⁾

El crecimiento bacteriano es un incremento en el número de células o aumento de la masa microbiana. El desarrollo es un componente esencial de la función microbiana, ya que una célula individual tiene un período de vida determinado en la naturaleza y la especie se mantiene solamente como resultado del crecimiento continuo de la población celular.

Una bacteria es una máquina capaz de duplicarse, los procesos sintéticos de crecimiento celular bacteriano implican no menos de 2000 reacciones bioquímicas de una gran variedad de tipos. Las reacciones principales de la síntesis celular son de polimerización, luego se ensamblan las macromoléculas, se forman estructuras celulares: pared celular, membrana citoplasmática, flagelos, etc.

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por los mismos microorganismos.

Para realizar una curva de crecimiento, los microorganismos se cultivan en un medio líquido y se incuban en un recipiente cerrado al que no se añade más cantidad de medio que la inicial; en consecuencia, las concentraciones de nutrientes disminuyen y las de los restos aumentan.

Se traza una gráfica donde se analiza el crecimiento de una población microbiana, que se divide por fisión binaria, en un medio de cultivo. Se representa la absorbancia emitida por la bacteria frente al tiempo de incubación.

Un método utilizado para obtener una curva de crecimiento es la medida de turbidez. Una suspensión celular aparece turbia a la vista porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuantas más células estén presentes mayor será la luz dispersada y, por tanto, mayor la turbidez, la cual, puede medirse con el espectrofotómetro que hacen pasar la luz a través de suspensiones celulares y detectan la cantidad de luz emergente no dispersada.

La curva de crecimiento tiene cuatro fases diferentes (**Fig. 4**):

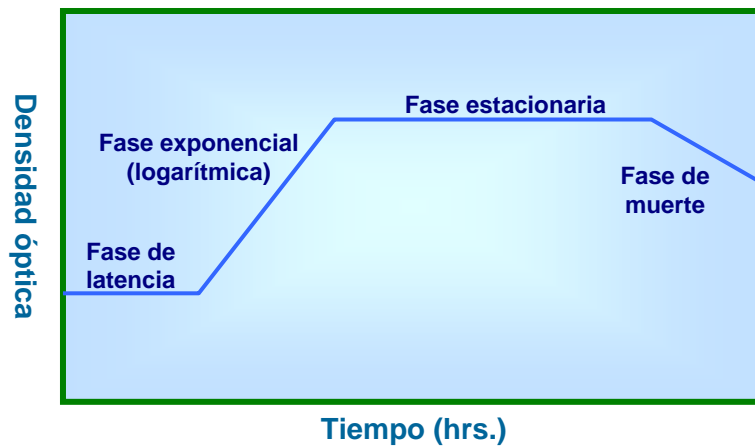


Figura 4. Curva de crecimiento microbiano en un sistema cerrado

- * **Fase de latencia:** en esta etapa no se produce un aumento inmediato del número de células o de masa, esto no quiere decir que las células permanezcan inactivas o latentes, al contrario, durante este estadio cada una de las células se encuentran muy activas sintetizando nuevos componentes. La duración de esta fase varía según la condición de los microorganismos y la naturaleza del medio.
- * **Fase exponencial:** aquí los microorganismos se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético, el tipo de medio y las condiciones en que crecen. La velocidad de crecimiento es constante; es decir, los microorganismos se dividen y se multiplican en número a intervalos regulares. La población es más uniforme, química y fisiológicamente.
- * **Fase estacionaria:** el crecimiento de la población cesa, esta fase se puede atribuir a gran variedad de circunstancias, sobre todo al agotamiento de algunos nutrientes y, en grado menos frecuente, a la producción de sustancias tóxicas durante el crecimiento.
- * **Fase de muerte:** después del periodo estacionario las bacterias pueden morir más rápidamente que la producción de células nuevas. En esta etapa, el número de células viables desciende exponencialmente, mueren a diferentes periodos debido a gran variedad de condiciones, pero las más importantes son el agotamiento de las sustancias nutritivas y acumulación de productos inhibidores como ácidos.

1.6 MEDIDAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO: RECuento DE CÉLULAS TOTALES Y VIABLES ⁽⁷⁶⁾

El crecimiento de poblaciones se mide estimando los cambios en el número de células, en la cantidad de algún componente de las mismas o en el peso total seco de las células. Existen varios métodos de contar el número de células o determinar la masa celular, adecuados para diferentes organismos.

Recuento de células totales

El número de células de una población se puede determinar contando una muestra con el microscopio mediante el método de recuento directo. Se emplean cámaras de recuento especiales cuya superficie está marcada con una rejilla con pequeños cuadrados de área conocida. En el microscopio se puede contar el número de células por unidad de área. La conversión de ese valor a número de células por mililitro de la suspensión original se hace fácilmente multiplicando por un factor de conversión que depende del volumen del tipo de cámara. Este método es rápido para conocer el número de células; sin embargo, entre sus limitaciones se tiene que no distingue células vivas de muertas, las células pequeñas son difíciles de ver en el microscopio y algunas posiblemente se pierden en el recuento, el método no suele ser adecuado para suspensiones con baja densidad celular.

Recuento de células viables

El método usual para realizar una determinación de células viables se basa en contar el número de bacterias de la muestra que son capaces de formar colonias en un medio sólido adecuado, la técnica se denomina recuento en placa o recuento de colonias. Por lo tanto, la técnica de conteo en placa se basa en el principio de que cada organismo viable dará origen a una colonia. La técnica de conteo en placa se usa rutinariamente y con resultados satisfactorios en la estimación de la población bacteriana. Tiene la ventaja de su precisión para contar los organismos cuando se encuentran en muy pequeñas cantidades.

Existen dos maneras de realiza: extensión en placa y método de vertido. En el primero, un cierto volumen de cultivo diluido, que no suele ser superior a 0.1 ml, se extiende sobre la superficie de una placa con medio sólido utilizando un asa estéril de extensión. La placa se incuba después hasta que aparecen las colonias y se cuenta su número. Por lo general, la muestra original se diluye de manera que el número de colonias que se desarrolla en la placa quede entre 30 a 300. Entre estas cantidades la cuenta es más exacta, y la posibilidad de interferencia en el

desarrollo entre un microorganismo y otro es mínima. Las “cuentas” se reportan como UFC por mililitro.

En el método del vertido en placa se pipetea un volumen conocido (01 -1.0 ml) de cultivo en una placa Petri estéril sobre la que se le añade el medio con agar fundido y se mezcla todo bien con suaves movimientos de la placa sobre la superficie de la mesa antes de dejar que se solidifique. Con este método se pueden usar volúmenes de inóculo mayores; sin embargo, con este método el organismo que se cuenta debe ser capaz de resistir la temperatura del agar fundido (45 °C.)

2. JUSTIFICACIÓN

Con el fin de prevenir la entrada de la EEB, a nivel mundial se está viendo limitada las importaciones de rumiantes vivos y de productos biológicos empleados para propósitos de investigación que principalmente están suplementados con órganos y secreciones de origen bovino, tales como: suero fetal, medios de crecimiento bacteriano, ingredientes en cosméticos y alimentos para mascotas, entre otros; que pueden provenir de lugares con focos de infección: Gran Bretaña y otros países de Europa Occidental.

Para proteger a los cerdos de contraer la PCP, se les inocular en las primeras semanas de haber nacido, una Toxo – bacterina compuesta por cultivos de *App* que son producidos en un medio de cultivo enriquecido llamado BHI, el cual es utilizado en la mayor parte de los experimentos científicos y cuenta con una infusión de cerebro - corazón bovino como ingrediente principal; por esta última razón, cabe la posibilidad que se encuentre contaminado con la isoforma infectiva del prion.

Ante la necesidad de evitar la presencia del agente proteico, actualmente, se desarrolló un nuevo medio de cultivo líquido, cuya materia prima proviene de países donde no se han reportado casos de la EEB, denominado PECE para el crecimiento de *App*, el cual, en este trabajo se evaluará si permite el desarrollo óptimo de 10 serotipos (1 al 10) de esta bacteria y con esto tener una nueva opción para su crecimiento.

3. HIPÓTESIS

Si los serotipos 1-10 de App se llegan a desarrollar en condiciones similares al BHI en PECE, ambos suplementados con NAD; entonces se tendrá una alternativa de crecimiento y garantizará seguridad en la fabricación de productos biológicos, previniendo la aparición y diseminación global de la EEB.

4. OBJETIVOS

4.3 GENERAL

- Demostrar la eficacia de un medio nuevo de cultivo líquido denominado PECE, para el crecimiento de serotipos 1 al 10 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*App*), comparándolo con el caldo BHI mediante la determinación de curvas de crecimiento de doce horas y cuentas viables con el fin de contar con una alternativa que permita el desarrollo de *App* en un medio que evite la diseminación de la EEB.

4.4 PARTICULARES

- Reactivar y tener en forma pura los serotipos de *App* identificados del 1 al 10.
- Preparar en forma adecuada los medios a probar, enriqueciéndolos con la misma cantidad del factor V (NAD).
- Realizar curvas de crecimiento de doce horas para 10 serotipos de *App*, utilizando ambos medios de cultivo.
- Determinar las UFC / ml de los diez serotipos de *App*. mediante una cuenta viable en placa.
- Realizar un estudio de correlación para conocer si los serotipos de 1 al 10 se desarrollaron en PECE similarmente que en BHI y además, obtener los datos de UFC/ml que se reporten como incontables.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Material de laboratorio:

Asa bacteriológica.

Barra magnética.

Cajas Petri desechables (SyM[®]).

Celdas para espectrofotómetro.

Espátulas.

Filtro metálico mediano.

Frascos de vidrio estériles.

Jeringas desechables sin aguja de 10 ml (PLASTIPAK[®]).

Matraces Erlenmeyer (PYREX[®]) con taparrosca de baquelita de 250 ml.

Matraces Erlenmeyer (PYREX[®]) con taparrosca de baquelita de 500 ml.

Matraz aforado de 100 ml (KIMAX[®]).

Matraz Erlenmeyer (PYREX[®]) de 1000 ml.

Mecheros Bunsen y mangueras de látex.

Membranas (millipore[®]) (0.45 y 0.22 μm).

Micropipeta de 2 a 10 μl (Oxford[®]).

Micropipeta de 40 a 200 μl (Oxford[®]).

Micropipeta de 1000 μl (Volac Ultra).

Microplacas de 96 pozos de fondo plano (GREINER BIO – ONE[®]).

Palillos estériles.

Pipetas desechables de 1 y 5 ml (GREINER BIO - ONE[®]).

Portaobjetos.

Puntas desechables para micropipetas.

Tubos capilares.

Tubos para centrifuga de 50 ml estériles (GREINER BIO - ONE[®]).

Vasos de precipitados (KIMAX[®]) de 100 y 250 ml.

5.1.2 Material biológico:

Cepas ATCC de serotipos 1 al 10 de *App*:

Serotipo	Cepa de referencia
1	4074
2	4226
3	1421
4	M62
5	K17
6	FE / 710
7	47033
8	405
9	CV / 3261
10	13039

Tabla 11. Cepas ATCC de *App* utilizadas

Cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* Cowan 1.

Sangre bovina desfibrinada.

5.1.3 Equipo

Congelador (American).

Refrigerador (American).

Balanza granataria (Triple beam balance 700 series).

Balanza analítica.

Parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate).

Autoclave (All American Modelo 1925X).

Estufa bacteriológica (Riossa).

Microscopio óptico (OLYMPUS® CH2).

Estufa orbital (NEW BRUNSWICK® serie 25).

Espectrofotómetro (COMPUR M® 2000 CS).

Centrifuga con control de temperatura (DAIMON® DPR 6000).

5.1.4 Reactivos

Reactivos de tinción de Gram (cristal violeta, lugol, alcohol –acetona y safranina).

Peróxido de Hidrógeno.

Discos para prueba de oxidasa.

Medio BHI (BD[®] Bioxon).

Agar – Agar (MERCK[®])

Medio Agar base sangre (MERCK[®]).

Medio Nuevo.

Glucosa (MERCK[®]).

NAD (Research Organics[®]).

Solución salina al 0.9 %.

Sangre bovina desfibrinada.

Agua destilada.

Formaldehído (CHEMICAL KEERNAR[®]).

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Preparación de medios de cultivo

Para las diferentes etapas del experimento: reactivación del serotipo, Prueba de satelitismo, dependencia del factor V (NAD), curva de crecimiento y cuenta viable en placa, se prepararon medios líquidos y sólidos.

5.2.1.1 Medios sólidos

Agar sangre:

Agar base sangre (Merck)	37.0 g
Sangre bovina desfibrinada	50 ml
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

Agregar a 1000 ml de agua destilada la base de agar sangre; evitando que la solución alcance la temperatura de ebullición del agua, disolverlo en calor auxiliándose con una barra magnética y una parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate). Esterilizar en Autoclave (All American

Modelo 1925X) a una temperatura de 121 °C, 15 lb. de presión por 15 minutos. Dejar que la solución se enfríe hasta llegar a una temperatura de 45°C para agregar la sangre bovina. Vaciar el medio en cajas Petri desechables (SyM). Esperar que gelifique el agar y conservar en refrigeración.

NOTA: Una caja Petri debe contener 20 – 25 ml de medio.

Agar BHI:

Medio BHI (BD [®] Bioxon)	37.0 g
Agar – agar (MERCK [®])	20.0 g
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

Disolver en calor el BHI (BD[®] Bioxon) y agar – agar (MERCK[®]) en el agua destilada, utilizando una barra magnética y una parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate). Esterilizar en Autoclave (All American Modelo 1925X) a una temperatura de 121 °C, 15 lb. de presión por 15 minutos. Vaciar el medio en cajas Petri desechables (SyM). Esperar que gelifique el agar y conservar en refrigeración.

NOTA: Una caja Petri debe contener 20 – 25 ml de medio.

Agar BHI / NAD

Medio BHI (BD [®] Bioxon)	37.0 g
Agar – agar (MERCK [®])	20.0 g
NAD al 0.5 % (Research Organics)	2. 0 ml
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

Disolver en calor el BHI (BD[®] Bioxon) y agar – agar (MERCK[®]) en el agua destilada, utilizando una barra magnética y una parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate). Esterilizar en Autoclave (All American Modelo 1925X) a una temperatura de 121 °C, 15 lb. de presión por 15 minutos. Al enfriarse un poco el medio, agregar el NAD (Research Organics). Vaciar el medio en cajas Petri desechables (SyM). Esperar que gelifique el agar y conservar en refrigeración.

NOTA: Una caja Petri debe contener 20 – 25 ml de medio.

5.2.1.2 Medios líquidos

Caldo BHI / NAD

Medio BHI (BD [®] Bioxon)	37.0 g
NAD al 0.5 % (Research Organics)	2.0 ml
Agua destilada	c.b.p. 1000

Disolver el medio en calor usando una parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate) y una barra magnética. Esterilizar en Autoclave (All American Modelo 1925X) a una temperatura de 121 °C, 15 lb. de presión por 15 minutos. Conservar en refrigeración.

Medio PECE

Proteosa peptona	10 g
Extracto de carne.	20 g
Caseína	2.5 g
Extracto de levadura.	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Disodio hidrogenofosfato	3 g
NAD (Research Organics) al 0.5 %	2.0 ml
Glucosa (MERCK [®]) al 20 %	2.5 ml
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

Disolver los seis primeros componentes en calor con ayuda de una parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate) y una barra magnética. Ajustar el pH a 7.0. Esterilizar en Autoclave (All American Modelo 1925X) a una temperatura de 121 °C, 15 lb. de presión por 15 minutos. Esperar que el medio se enfríe un poco para agregar el NAD (Research Organics) y la glucosa. Conservar en refrigeración.

5.3 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Los serotipos ATCC del 1 al 10 de *App* (véase **Tabla 11**) fueron proporcionados por el laboratorio 3 de Virología de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, los cuales se encontraban suspendidos en una sustancia crioprotectora contenida en crioviales y sumergidos en Nitrógeno líquido para su conservación.

La metodología siguiente fue realizada para cada uno de los serotipos del 1 al 10 de *App*.

5.3.1 Reactivación de la cepa bacteriana

El serotipo de *App* proporcionado fue descongelado gradualmente, es decir, al sacarse del Nitrógeno líquido se pasó a un congelador a una temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 10 min.; posterior a eso se metió en un refrigerador a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 10 min. y finalmente se mantuvo a temperatura ambiente hasta lograr un descongelamiento total.

Con ayuda de un asa bacteriológica, previamente flameada, se tomó una muestra del serotipo presente en el criovial y se sembró por la técnica de dilución en tres placas de agar BHI enriquecido con NAD, Se dejó incubar en la estufa bacteriológica (Riossa) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Las colonias obtenidas se utilizaron para el apartado: 5.3.2 y 5.4.

5.3.2 Identificación

Se identificó al género bacteriano, mediante la realización de:

- * tinción de Gram,
- * catalasa,
- * oxidasa ,
- * O/F
- * Prueba de CAMP.
- * Prueba de Satelitismo: con ayuda de un asa bacteriológica, previamente flameada, se tomó una asada de una colonia de *App* y se sembró en tres placas de agar sangre y tres de agar BHI, de forma masiva hasta la mitad de la placa. A todas estas, se les pusieron dos estrías de la cepa nodriza, *Staphylococcus aureus* Cowan 1, sobre el sembrado. Se incubaron en la estufa bacteriológica a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un período de 24 hrs.
- * Dependencia del factor V (NAD): Se sembró masivamente, utilizando una asa bacteriológica estéril, el serotipo correspondiente de *App* en agar BHI y agar BHI / NAD por triplicado para asegurarnos que la bacteria necesita NAD para desarrollarse.

5.4 CURVA DE CRECIMIENTO

Se utilizaron dos matraces Erlenmeyer de taparroca PYREX[®] de 250 ml y dos de 500 ml, en los primeros dos se elaboraron 150 ml de caldo BHI y el resto se ocuparon para preparar 500 ml de caldo del mismo medio. Asimismo, se elaboraron las mismas cantidades de caldo PECE (Ver preparación de medios en el apartado 5.2.1).

Para llevar a cabo la curva de crecimiento se empleó una estufa orbital NEW BRUNSWICK[®] serie 25 y un espectrofotómetro COMPUR M 2000 CS[®].

De las colonias de *App* obtenidas en 5.2, las cuales ya estaba confirmada su identificación, por la técnica de dilución y con un asa bacteriológica redonda, previamente flameada, se sembraron en 3 placas de agar BHI / NAD y se incubaron en una estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. De este crecimiento, se tomó muestra de una colonia para igualar un tubo al 0.5 de Mac Farland, se tomó de este 2 ml para inocular cada uno de los cuatro caldos de BHI y PECE contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml, estos se metieron a la estufa orbital que los mantuvo en agitación de 200 rpm y a una temperatura de 37 °C.

Transcurrida una hora de mantener los caldos en la estufa orbital, se sacaron de él y se procedió a tomar con una micropipeta de 1000 µl Volac Ultra, alícuotas de 2 ml de los matraces Erlenmeyer de 250 ml para leer la absorbancia de los medios empleando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 546 nm.

De los matraces de 500 ml, tanto para BHI como para PECE, se tomaron muestras de 40 ml en tubos estériles, para observar la cantidad de biomasa obtenida cada hora. Estos tubos se centrifugaron a 3500 rpm por 20 minutos. Se decantaron los sobrenadantes en otros tubos estériles y se congelaron mediatamente a este paso. Las pastillas se suspendieron con Skill Milk y en refrigeración para su conservación. Lo que se obtuvo en esta parte de la metodología se guardó para un tratamiento futuro.

Todos estos pasos se repitieron cada hora durante un período de 12 horas.

5.5 CUENTA VIABLE EN PLACA

A la par de la curva de crecimiento, cada hora, de los matraces Erlenmeyer de 250 ml. se tomaban, con una micropipeta OXFORD® con puntas de plástico estériles, alícuotas de 10 µl de ambos medios líquidos: BHI y PECE. Ese volumen se depositaba en un pozo de una microplaca de 96 pozos y se procedía a hacer diluciones decimales. La **tabla 11** muestra las diluciones finales, que fueron hechas con base a las absorbancias obtenidas, de las alícuotas tomadas de cada uno de los medios de cultivo por cada hora.

Serotipo	HORAS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
2	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
3	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴
4	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴
5	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
6	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
7	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³
8	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
9	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³
10	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³

Tabla 12. Dilución final de las alícuotas tomadas de BHI y PECE, en cada hora de la curva de crecimiento para realizar las cuentas viables en placa.

Del pozo que contenía la dilución final, se tomaban 10 µl con la micropipeta y se depositaban en el centro de una placa de agar BHI / NAD, esta gota se extendía por todo el agar con ayuda de un tubo capilar en forma de gancho previamente flameado. Este paso se realizaba para ambos medios de cultivo y por duplicado.

Las cajas de agar BHI / NAD inoculadas, se incubaron a 37 °C por 24 horas. Se contaron las colonias de *App* para determinar las UFC / ml de cada hora de la curva de crecimiento tanto para BHI como para el PECE.

La determinación de las UFC/ml se realizó de la siguiente manera:

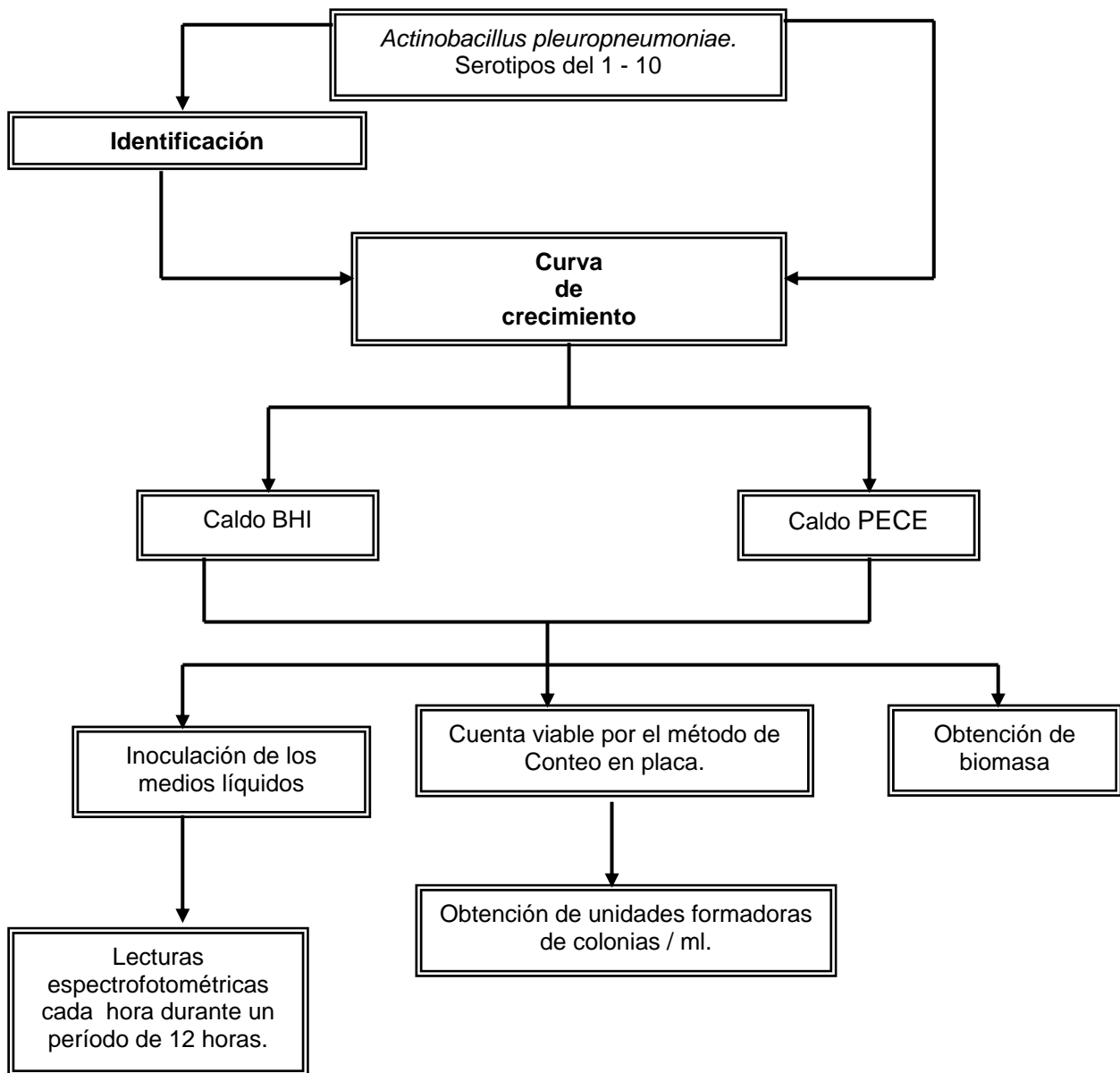
- * Realizar el conteo de las colonias que aparecieron en las placas de agar BHI / NAD. Si el número de colonias obtenido, se encuentra entre 30 y 300, continuar con los siguientes pasos, de lo contrario reportar como incontables.

- * De la cantidad obtenida, calcular el número de colonias que habrá en 1 ml de muestra, tomando en cuenta que se tomó de cada medio un volumen de 10 μ l.

- * El valor obtenido se multiplica por la dilución final de la muestra y por último ese resultado nos indica las UFC/ml.

Las bacterias que crecieron en cada placa se recolectaron en frascos estériles, con ayuda de un tubo capilar en forma de gancho y solución salina estéril. Se agregó por agitación formaldehído al 5 % en una proporción de 1 ml por cada 100 ml de solución. Se realizó prueba de inocuidad, sembrando una asada del contenido de estos frascos en una placa de agar BHI / NAD por la técnica de sembrado masivo. Todo lo anterior con el fin de inactivar las cepas de *App*.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. RESULTADOS

7.1 MEDIOS DE CULTIVO BHI Y PECE

El BHI, como ya todos lo conocemos es un polvo de color amarillo paja y al ser preparado se disuelve fácilmente en el agua destilada. El caldo que se obtiene es de color amarillo claro.

El PECE, consta de seis componentes sólidos, los cuales se disuelven fácilmente en agua destilada. Se obtiene un caldo de color canela.



Figura 5. Caldos BHI y PECE.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE *App*

7.2.1 Gram

Se obtuvieron Bacilos y cocobacilos Gram (-) ($0.3 \times 1.5 \mu\text{m}$), presentan pleomorfismo y pueden formar cadenas cortas.

7.2.2 Catalasa, Oxidasa, Oxidación – Fermentación de glucosa y motilidad.

La **Tabla 11** cita que todos los serotipos de *App* carecen de las enzimas catalasa y oxidasa, dado a los resultados alcanzados.

APP	PRUEBA BIOQUÍMICAS PRIMARIAS			
SEROTIPOS	CATALASA	OXIDASA	O/F	MOTILIDAD
1	-	-	NT	-
2	-	-	NT	-
3	-	-	NT	-
4	-	-	NT	-
5	-	-	NT	-
6	-	-	NT	-
7	-	-	NT	-
8	-	-	NT	-
9	-	-	NT	-
10	-	-	NT	-

Tabla 13. Resultados de los serotipos 1 – 10 a las pruebas de catalasa, oxidasa, O/F y motilidad.

7.2.3 Prueba de CAMP

Los serotipos de 1 a 10 de *App* utilizados dan el fenómeno de CAMP positivo, se observa la clásica punta de flecha en el agar sangre, que es ocasionada por la hemólisis provocada por la acción sinérgica de la beta – hemolisina de la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* y la cohemolisina producida por *App*. Ver Fig. 6



Figura 6. Prueba positiva del fenómeno de CAMP de *App*.

7.2.4 Satelitismo

La importancia de realizar la prueba de Satelitismo fue determinar la dependencia de este género bacteriano por uno de los dos factores: X o V. En este caso, *App* requiere del Factor V (NAD); por lo cual, es necesario que esté presente en el medio en donde se inocule *App*, ya que actúa como coenzima participando en las reacciones de óxido – reducción de su metabolismo y sin esté la bacteria no se desarrollaría.

En este estudio se hizo evidente lo anteriormente dicho, ya que observamos que *App* necesita netamente para su crecimiento en medios, que estén enriquecidos con NAD, que sea incorporado sintéticamente como en el caso del BHI/NAD (1 mg/ml), en donde es evidente que en un ambiente enriquecido *App* da buenos rendimientos.

O bien cuando se es proporcionado por el metabolismo de *Staphylococcus aureus*, bien sea en agar BHI en el cual *App* limita su desarrollo siendo dependiente específicamente de la producción del factor solo por la cepa nodriza; o si esto se ve suplementado con el lisado de los glóbulos rojos presentes en el Agar Sangre, viéndose liberado ambos agentes y así se ve beneficiada la cepa trabajada por dos lados.

Todos los serotipos trabajados muestran una dependencia por el factor V (NAD). Esto se observa en placas de agar sangre y BHI representadas en la **Fig. 7 y 8**, donde se empleó la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* Cowan I, el cual sintetiza el mencionado.

NOTA: se muestra el resultado sólo de los serotipos 8 y 9, debido al exceso de información que abarcaría al mostrar al resto de los serotipos.



Figura 7. Resultado de la Prueba de Satelitismo del S – 8 en placas de agar sangre y agar BHI.

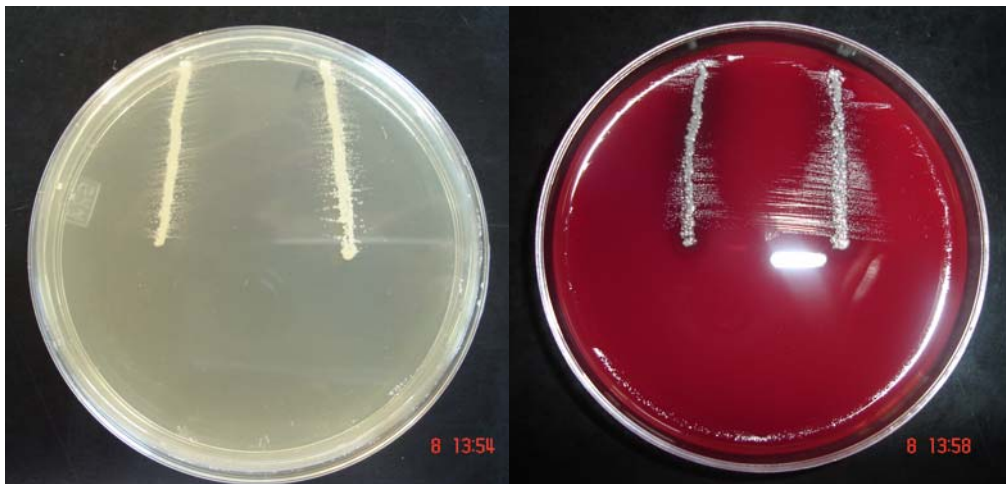


Figura 8. Resultado de la Prueba de Satelitismo en placas de agar sangre y agar BHI del S – 9.

Además, se observó la dependencia del factor V en placas de agar BHI suplementado con 1 μg / ml de NAD (**Fig. 9**) Todos los serotipos de *App* crecieron en este medio, mientras que en agar BHI libre de NAD, no lograron desarrollarse.

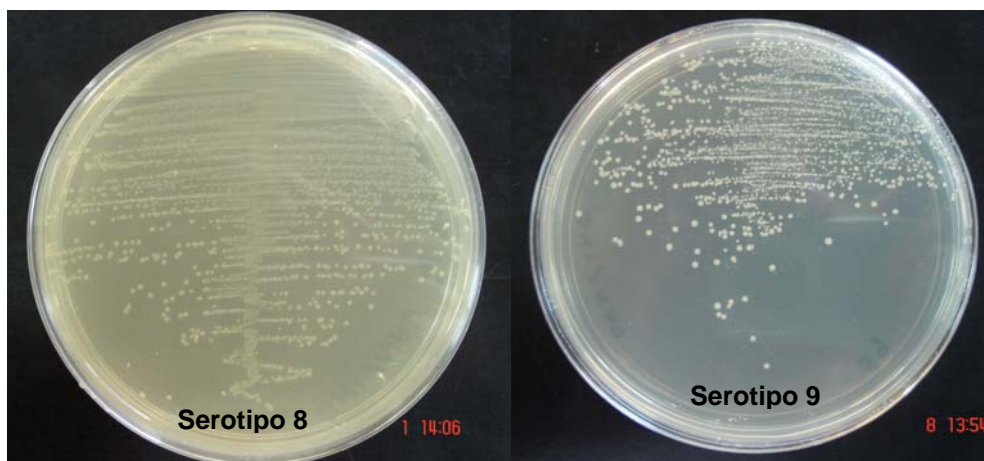


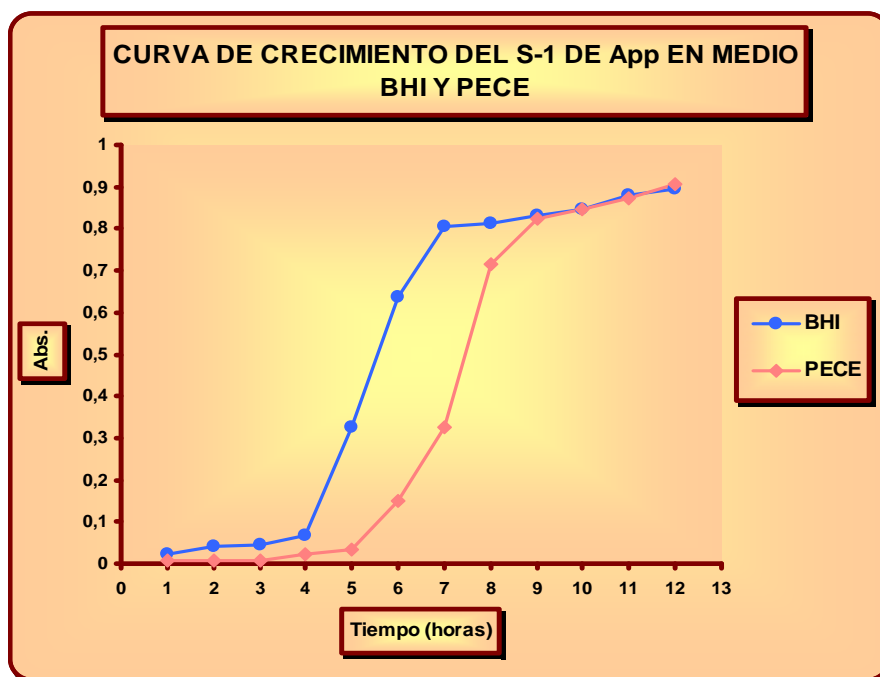
Figura 9. Resultados del requerimiento del factor V en placas de agar BHI / NAD de los S-8 y S-9.

7.3 CURVA DE CRECIMIENTO

Se exhiben los comportamientos de crecimiento de los serotipo 1-10 de *App* al crecerlos en los nutrientes que proporcionan los caldos de BHI y PECE. Dicha interpretación se representa en las gráficas siguientes que expresan las curvas de crecimiento de doce horas cada una.

7.3.1 Crecimiento del S-1 de App en medio BHI y PECE.

En el **Gráfico 1** se muestra el comportamiento del S-1, por un lapso de 12 hrs. en los medios a probar. Aquí se observa que este serotipo tiene mejor dinámica en general en BHI, que en PECE.



Gráfica 1. Tendencia positiva que muestra el S-1 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.

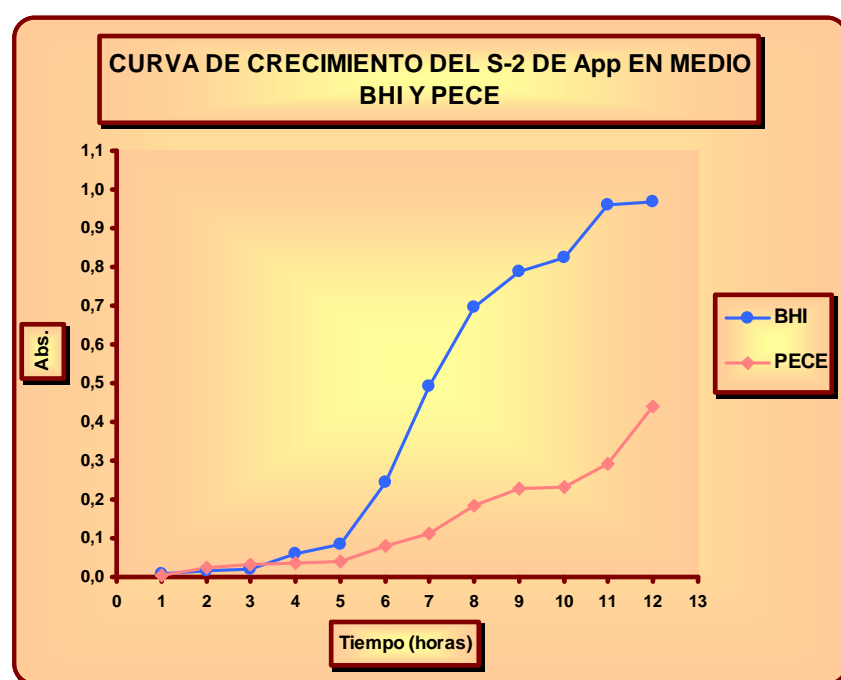
Si bien en lo que respecta a la fase lag o de latencia del crecimiento de este serotipo, la predisposición que se señala es casi similar en ambos medios; pero desde inicio aunque mínimo, es superior el BHI esto dentro de las primeras cuatro horas, con una absorbancia de 0.066; mientras que esta primera fase PECE la lleva en un período de cinco horas, con absorbancia de 0.034.

La fase exponencial se cumple en un lapso de tres horas en el BHI, con amplias diferencias entre cada una de las absorbancias (0.327, 0.637, 0.804), que nos refiere un desarrollo excelente del serotipo; caso que se ve restringido con una producción limitada y en un tiempo mayor de cinco horas en PECE; con absorbancias que van de 0.034 a 0.842 (véase en apéndice tablas.)

En el caso de la fase estacionaria en el BHI mantiene un lapso de poca variación, desde la séptima hora a la doceava, con absorbancias desde 0.804 a 0.896 y con respecto a PECE este período parte de la novena hora, con absorbancias de 0.842 a 0.906 en la doce; que nos indica la posibilidad si una o dos horas más de amplitud de trabajo pueda estabilizar dicha fase y el margen entre absorbancias sea el mínimo.

7.3.2 Crecimiento del S-2 de App en medio BHI y PECE.

En el **Gráfico 2** se muestra el comportamiento del S-2 de App por un período de 12 horas, observándose una tendencia muy superior en el medio BHI; mientras PECE muestra un crecimiento limitado, casi de la mitad, comparando con lo manifestado en el S-1.



Gráfica 2. Tendencia positiva que muestra el S-2 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.

La fase de latencia en este caso fue de cinco horas en ambos medios, pero BHI inicio por encima de PECE, ya en la segunda y tercera presento absorbancias de 0.016 y 0.022, que son inferiores a las de PECE 0.025 y 0.034. De aquí las dos horas subsecuentes el BHI retomo camino y marco una diferencia hasta el final.

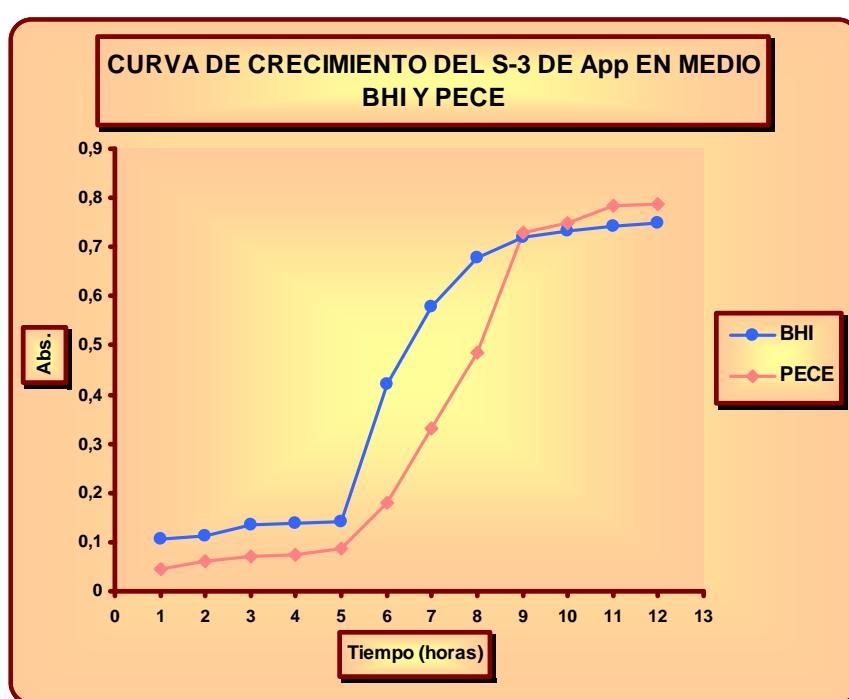
La fase exponencial para el BHI en el **Gráfico 2** muestra dos tendencias positivas que no permiten determinar una fase estacionaria, dado que, a partir de la hora cinco a la doce mostraron crecimiento y no se observo una etapa de mantenimiento. A partir de la hora cinco a la nueve con absorbancias de 0.083 a 0.787 se define la primera tendencia y la segunda se marca a partir de hora diez a la doce con absorbancias de 0.824 a 1.058. Con un lapso pequeño de estacionamiento entre la nueve y diez (0.787-0.824) que es importante de resaltar.

Esta fase en PECE de igual forma indica dos tendencias que marchan en tiempo, al par a BHI. La primera se ve reflejada de la hora cinco a la nueve con absorbancias de 0.040 a 0.23, que para esa hora en BHI el valor de absorbancia era de más del triple. La segunda se inicia a partir

de la hora diez a la doce con absorbancias de 0.231 a 0.44, que esta ultima a comparación con BHI; la diferencia es más del doble. Y la etapa que no tuvo variación fue entre la hora nueve o diez, con una discrepancia de 0.001.

7.3.3 Crecimiento del S-3 de App en medio BHI y PECE.

En el **Gráfico 3** se ostenta el proceso de crecimiento del S-3 de App durante doce horas, en donde en BHI es mejor durante nueve horas, de aquí al final el presente mejor producción del serotipo.



Gráfica 3. Tendencia positiva que muestra el S-3 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.

En la fase lag se denota el desarrollo paralelo y casi horizontal del S-3, dentro de las primeras cinco horas en ambos medios; pero siendo esta mejor en BHI que en PECE.

En la fase exponencial se muestra un rendimiento más idóneo en BHI, que se produce en un lapso de cuatro horas con absorbancia inicial de 0.141 llevando al serotipo al cambio de fase en la hora nueve con una absorbancia de 0.72. En el caso de PECE se observa un rezago del desarrollo, de la hora cinco a la ocho con absorbancias de 0.087 a 0.484; que para el siguiente tiempo fue superior aunque no significativamente al BHI con una absorbancia de 0.729.

En la fase estacionaria se exhibe lo que no se había manifestado en los dos serotipos anteriores y esto es que PECE fue y término por encima del BHI, aunque no con valores

representativos pero si con un mejor progreso de S-3 a lo largo de las últimas tres horas. Ver apartado de tablas en el apéndice.

7.3.4 Crecimiento del S-4 de App en medio BHI y PECE.

El **Gráfico 4** presenta el crecimiento del S-4 de App en un tiempo de 12 horas. En donde hasta la octava hora el que mostró mejor rendimiento fue el BHI pero después de este PECE expresó gran productividad.

La fase de latencia nos indica una superioridad de casi el doble en BHI con absorbancias que fueron desde 0.124 a 0.143 en un ciclo de cinco horas, las cuales se muestra casi una linealidad. Contrastando con PECE, que tuvo un inicio poco favorable para el desarrollo del S-4, con absorbancias que van de 0.035 a 0.085.

Para el caso de la fase exponencial, la diferencia de crecimiento es de una hora, en BHI se prueba en tres horas, que van de la hora cinco a la ocho con absorbancias de 0.143 a 0.814; siendo importante el período de la quinta a la séptima que es donde se dispara el desarrollo bacteriano en los matraces. En el caso de PECE, la tendencia es en cuatro horas, con absorbancias de 0.085 a 0.899, que demuestra un desempeño adecuado pero siendo mejor en el otro medio. (Ver Tabla en el apéndice)

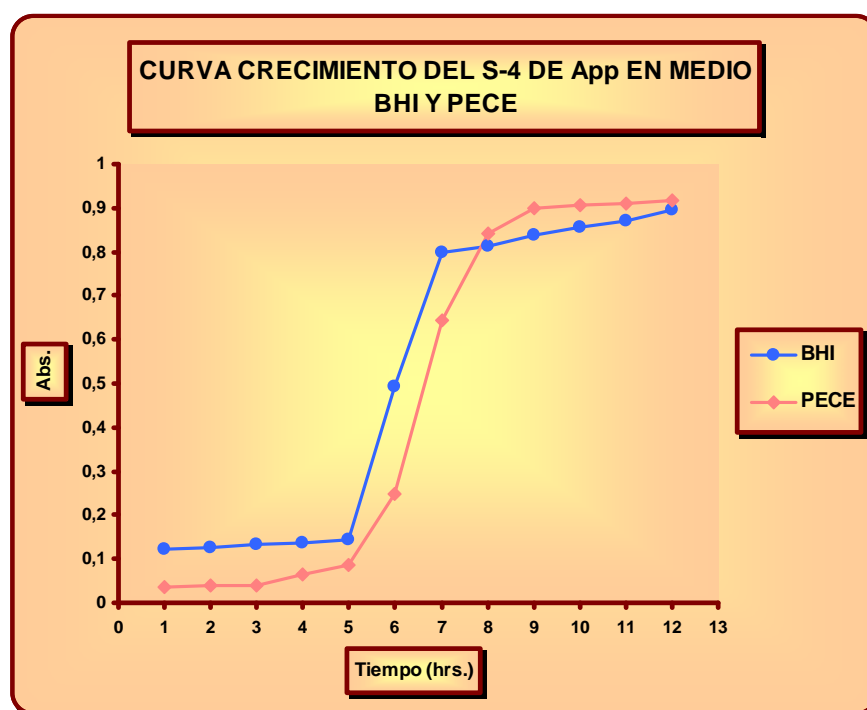


Gráfico 4. Tendencia positiva que muestra el S-4 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.

Finalmente en la fase estacionaria término con comportamiento superior PECE, que da pauta a citar un crecimiento bajo en las primeras cinco horas, pero después a esto se dispara el desarrollo, concluyendo de forma superior, con diferencia de 0.021 en absorbancia con el BHI.

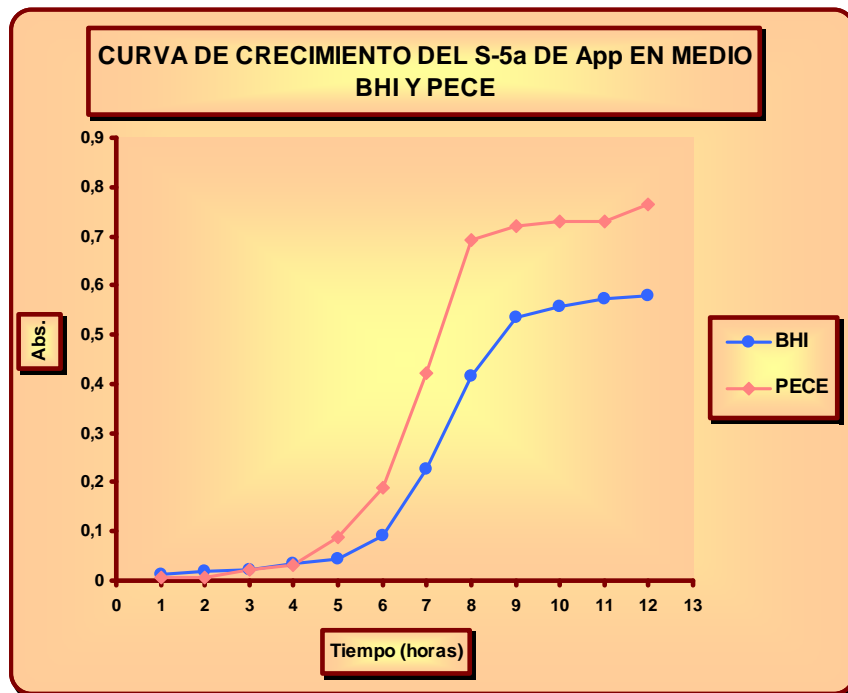
7.3.5 Crecimiento del S-5a de App en medio BHI y PECE.

En el **Gráfico 5** se indica la tendencia de crecimiento del S-5a en medio BHI y PECE durante doce horas, siendo este último el que permite un mejor rendimiento entre cada una de las tres fases.

En la primera fase, durante las dos horas iniciales el BHI tiene mejor desempeño, dado que sus absorbancias doblan a las del otro medio; posterior a estas la hora tres y cuatro en ambos guardan una relación estrecha. En las siguientes horas y hasta el final PECE dio mejores condiciones y rendimiento para el S-5a.

La fase exponencial se desempeña entre cuatro a cinco horas para BHI y PECE respectivamente, pero PECE abarcó su ciclo desde la hora cuatro hasta la nueve con un rango de absorbancia de 0.0332 a 0.721; siendo del doble la producción del serotipo en las tres primeras horas de esta fase. Así en BHI la etapa corrió de la hora cinco a la nueve con valores de 0.043 a 0.535, este último guardando una diferencia significativa de 0.186 que se puede observar en la **Tabla 18** del apéndice.

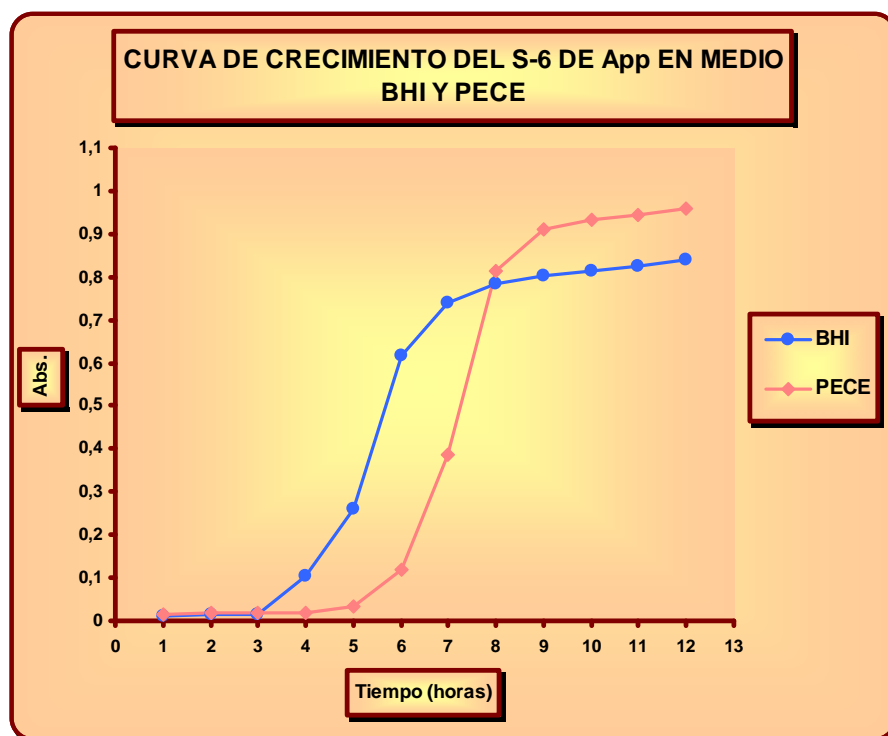
La última etapa se desempeño en ambos medios en un tiempo similar de tres horas, guardando una diferencia de 0.186 a 0.188; que permite determinar que a lo largo de toda la curva de crecimiento este serotipo y el S-7, que más adelante se interpretará su resultado, tengan mejor rendimiento en PECE que en BHI.



Gráfica 5. Tendencia positiva que muestra el S-5a durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.

7.3.6 Crecimiento del S-6 de App en medio BHI y PECE.

El S-6 se desarrolla adecuadamente en ambos medios, esto se demuestra en la **Gráfica 6**, ya que ambas curvas tienen una tendencia positiva y demuestran las distintas etapas de crecimiento del serotipo.



Gráfica 6. Tendencia positiva que muestra el S-6 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.

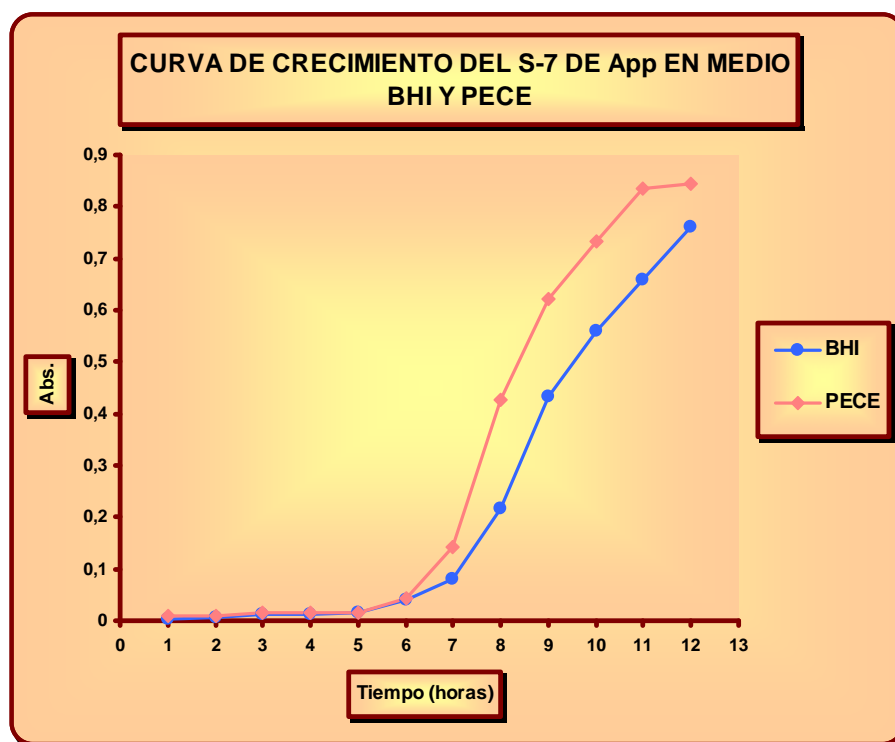
Inicialmente, hay que resaltar que la primera fase de la curva de crecimiento (de latencia) se lleva a cabo en tres horas para el BHI y cinco horas para PECE. La comparación de los datos de las absorbancias de ambos medios, en los primeros ciento ochenta minutos varían muy poco; estos valores a pesar del bajo rango de diferencia son mayores para PECE (Ver Tabla en apéndice).

Al comenzar la fase exponencial, lo anteriormente mencionado se modifica en la hora cuatro, lográndose una absorbancia mayor para BHI (0.104) que para PECE (0.02), es decir ahora los valores en este tiempo son más altos para la curva de BHI. Esta afirmación se mantiene hasta la hora ocho (ambos medios sustentaban aún la fase exponencial de crecimiento del S-6) ya que es en este momento cuando el desarrollo bacteriano se ve más favorecido en PECE y como consecuencia de esto, el dato de absorbancia que es de 0.785, supera por una diferencia mínima al de BHI. Desde este momento y hasta el final del ensayo, los valores de absorbancia de PECE superaron a los de BHI. Además, cabe citar que la fase exponencial del S-6 en BHI inició antes que en PECE, abarcando de la hora tres a la ocho de la curva de crecimiento; mientras, que para el PECE comprendió de la cinco a la nueve.

La fase estacionaria comenzó en la misma hora para ambos medios, recordamos que las absorbancias en este punto de la curva son superiores para PECE, manifestándose una diferencia de más de 0.1, la cual se hace muy notoria dentro del **Grafico 6**.

7.3.7 Crecimiento del S-7 de App en medio BHI y PECE.

En la **Gráfica 7** se presenta mediante una curva de crecimiento el desarrollo del S-7 durante doce horas en PECE y BHI. El comportamiento de este serotipo fue muy distinto a los otros ya que en esta ocasión, en el caso del BHI no se aprecian las tres fases de la curva, únicamente se observa la fase de latencia y exponencial.



Gráfica 7. Tendencia positiva que muestra el S-7 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.

Tanto para el BHI como para PECE, la fase de latencia dura cinco horas, la diferencia de absorbancias se muestra en el apéndice de tablas. Las cuales si se comparan, no varían mucho, se observan valores que se encuentran entre 0.003 a 0.039.

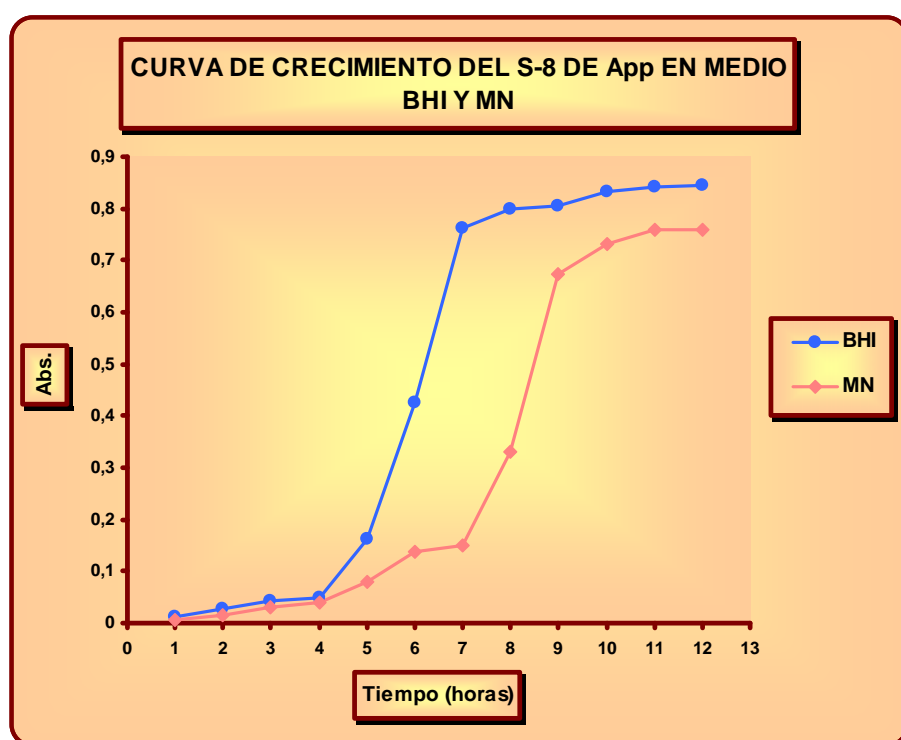
Por otro lado, la fase exponencial, en el caso del BHI, las absorbancias expresadas, indican que esta etapa comienza en la hora seis; posteriormente, los valores obtenidos van aumentando, el incremento más notorio se ve desde la hora ocho con un dato de 0.216. Mientras, que para PECE, el período exponencial abarca cinco horas que van de la seis a la once, los valores de absorbancias para este medio se mantienen de 0.043 a 0.835.

La etapa estacionaria sólo se presenta en PECE; aunque, esta información no se podría asegurar pues solo esta sustentado por un lapso de dos horas, en las que se obtuvieron absorbancias de 0.835 y 0.844 para la hora once y doce, respectivamente.

Finalmente, se tiene que hacer destacar que aunque el BHI mantenía en aumento sus absorbancias conforme pasaban las horas, estos valores, no superaron a los de PECE desde la hora seis.

7.3.8 Crecimiento del S-8 de App en medio BHI y PECE.

La **Gráfica 8** manifiesta que el S-8 posee una tendencia de crecimiento similar en ambos medios, la cual, es positiva y se distinguen claramente sus tres fases. En cuanto a la fase de latencia, se hace notar que se llevó a cabo en cuatro horas, tanto para PECE como para el caldo BHI; pero se refleja que las absorbancias obtenidas durante este período son totalmente distintas, conservándose valores un poco más altos para BHI desde la hora uno.



Gráfica 8. Tendencia positiva que muestra el S-8 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.

El BHI proporciona las condiciones para que la etapa exponencial se desarrolle en un tiempo de tan solo cuatro horas; mientras que en PECE se efectúa en seis, es decir, esta fase de la curva dura dos horas más en comparación con el BHI. Las absorbancias, que reflejan la proliferación del S-8, en esta fase siguen manteniéndose altas para BHI, haciéndose esto mas notorio en la hora seis con un valor de 0.426 contra 0.137 de PECE. Pero, igual que en la fase logarítmica, el crecimiento del S-8 es constante en ambos medios de cultivo.

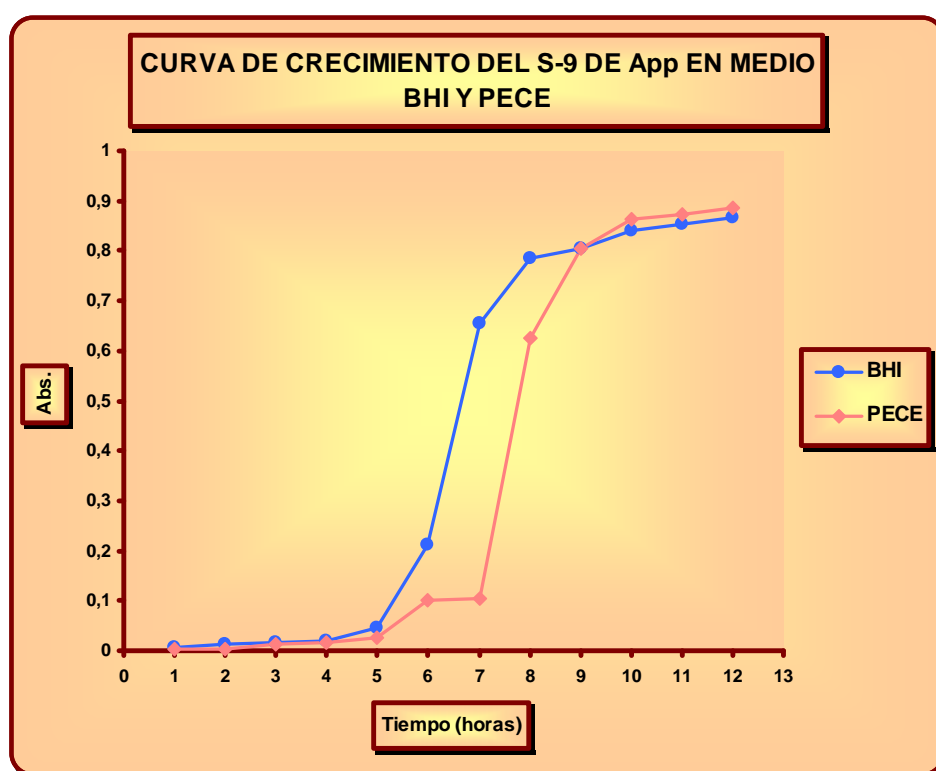
La última etapa de la curva de crecimiento, en el caso de BHI, empieza en la hora ocho; mientras que en PECE comenzó a partir de la diez. Las absorbancias en esta fase ya son constantes con un valor para el BHI de 0.8246 y 0.756 para PECE. Nuevamente, el BHI conserva

las cantidades de absorbancia más altos, aunque la diferencia entre estos valores no es muy elevada.

En general, en el desarrollo de esta curva las absorbancias obtenidas, en todo momento, fueron mayores para el BHI. La fase logarítmica duro el mismo tiempo para ambos medios (cuatro horas). El tiempo de la fase exponencial fue mayor para PECE que para BHI por una diferencia de dos horas y por lo tanto la fase estacionaria inició después.

7.3.9 Crecimiento del S-9 de App en medio BHI y PECE.

En el **Gráfico 9** se muestra el comportamiento del S-9 en BHI y PECE en un tiempo de 12 horas. Se observa que la tendencia de ambas curvas es positiva y los valores de absorbancia aumentan cada hora.



Gráfica 9. Tendencia positiva que muestra el S-9 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.

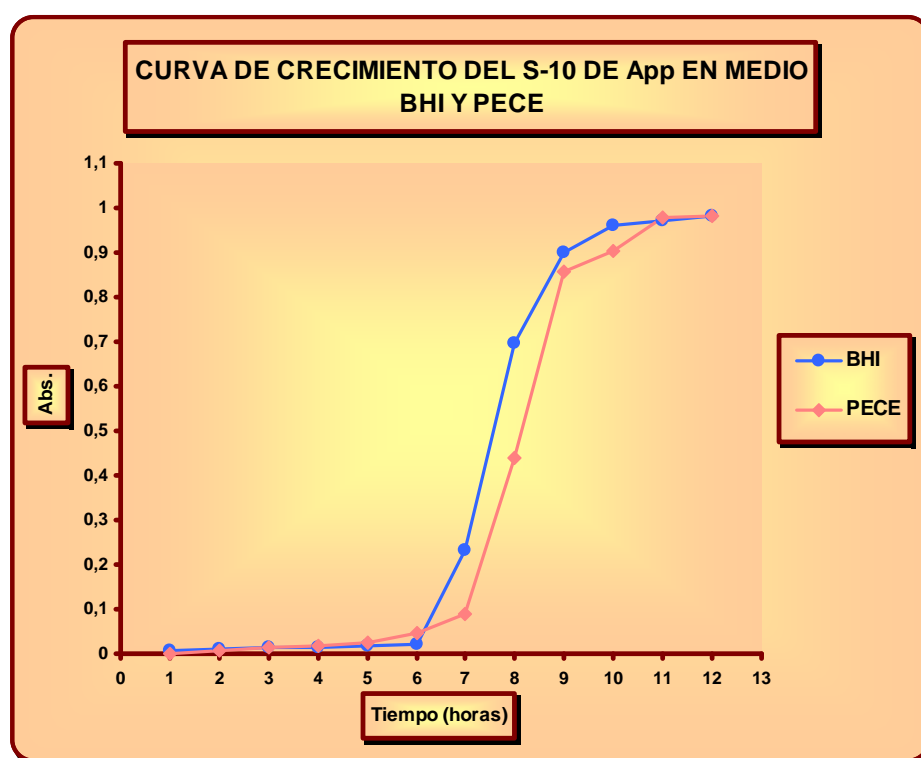
Las fases de crecimiento se manifiestan claramente, el tiempo que tardan en desarrollarse son semejantes para los dos medios, es decir, duran lo mismo: La fase de latencia se mantuvo 5 horas, la exponencial cuatro y la estacionaria tres.

La única diferencia de lo anterior, como en el resto de las gráficas, son las absorbancias obtenidas, el BHI alcanzó los valores más altos hasta la hora ocho, el contraste más marcado de esto, se muestra en la hora seis donde se alcanzó 0.656 del BHI contra 0.104 de PECE.

Pasando la hora diez, la información de las absorbancias logradas, apuntan que son mayores para PECE, pero la diferencia de estos valores es mínima. Además, se encontrará que las absorbancias oscilan entre 0.841 y 0.885 y que esto se lleva a cabo dentro de la fase estacionaria.

7.3.10 Crecimiento del S-10 de App en medio BHI y PECE.

En la **Gráfica 10** se representa la conducta de desarrollo que tuvo el S-10 en los medios de cultivo a probar de este trabajo, se observa una adaptación de la bacteria ya que manifiesta los tres períodos de crecimiento.



Gráfica 10. Tendencia positiva que muestra el S-10 durante 12 horas de crecimiento, tanto en medio BHI, como en PECE.

Los puntos que se muestran en la gráfica manifiestan que la tendencia de las curvas para ambos medios es positiva y además semejante, sobretodo en la fases: lag y estacionaria; ya que en ellas, no solo coincide sólo la tendencia sino que también el valor de las absorbancias.

Tomando en cuenta los datos obtenidos, la curva de crecimiento del BHI, en la fase logarítmica abarcó hasta la hora seis y para PECE hasta la siete. La diferencia de los valores resultantes en esta etapa es mínima; por ejemplo, en la hora tres fue de 0.016 para ambos medios de cultivo.

La duración de la fase exponencial del crecimiento del S-10 fue la misma para ambos medios, tres horas, pero las absorbancias marcan una diferencia. Durante este período, los valores para BHI son más altos que para PECE, esto se puede ejemplificar con la hora siete.

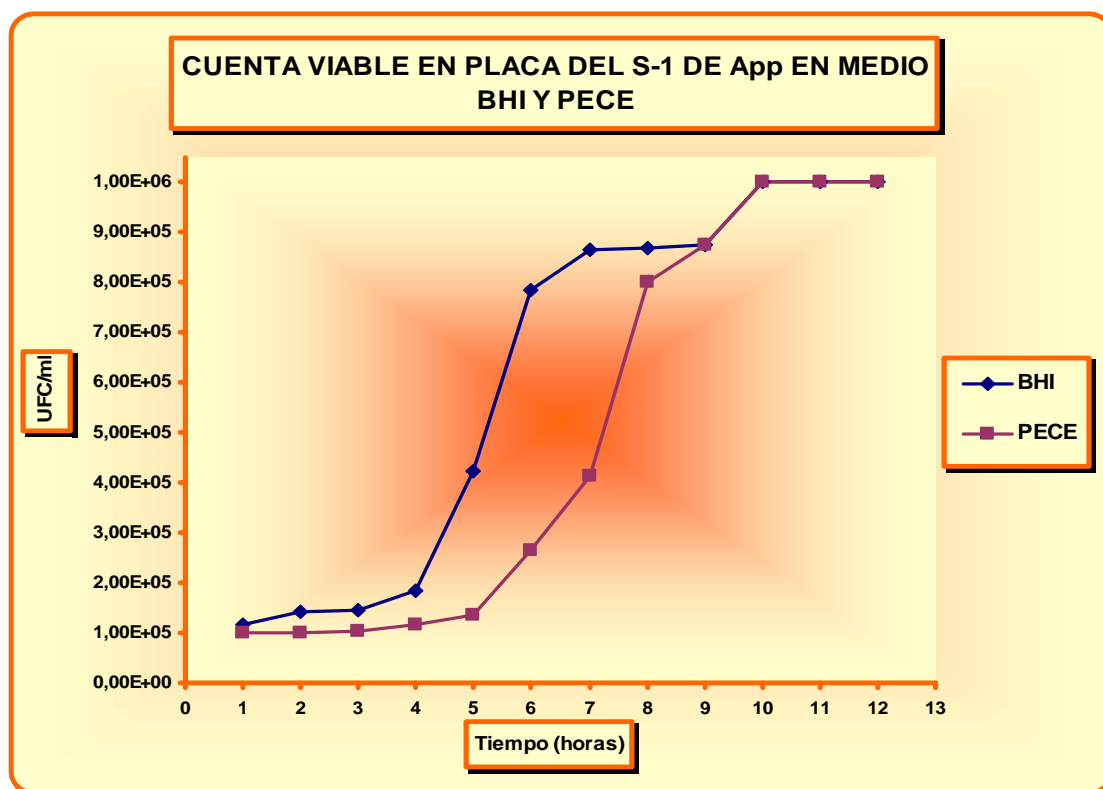
Por último, comparando PECE y el BHI en la fase estacionaria, se observa que los resultados obtenidos, en la **Gráfica 10**, son casi idénticos en la disposición de la curva y en las absorbancias. El tiempo de duración de esta etapa difiere por una hora, para el BHI dura tres y dos en PECE.

7.4 CUENTA VIABLE EN PLACA

Como complemento a la curva de crecimiento, se evaluó mediante una cuenta viable en placa si los serotipos de *App* son capaces de desarrollar colonias en agar BHI / NAD durante el período de doce horas. Haciendo hincapié que las diluciones empleadas fueron cambiando de acuerdo al comportamiento de las absorbancias.

7.4.1 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 1 en BHI y PECE.

Al observar los puntos del **Gráfico 11**, las UFC / ml del S -1, fueron contables en PECE y en BHI en un período de nueve horas que comprendió la cinética. En BHI son mayores que para PECE desde la primera hora, manteniéndose así hasta la novena, a partir de este tiempo las UFC/ml de PECE, alcanzaron a las de BHI manteniendo una tendencia paralela; con una diferencia de 1450 UFC/ml entre ambos medios (**Ver Tabla 24 en el apéndice.**)

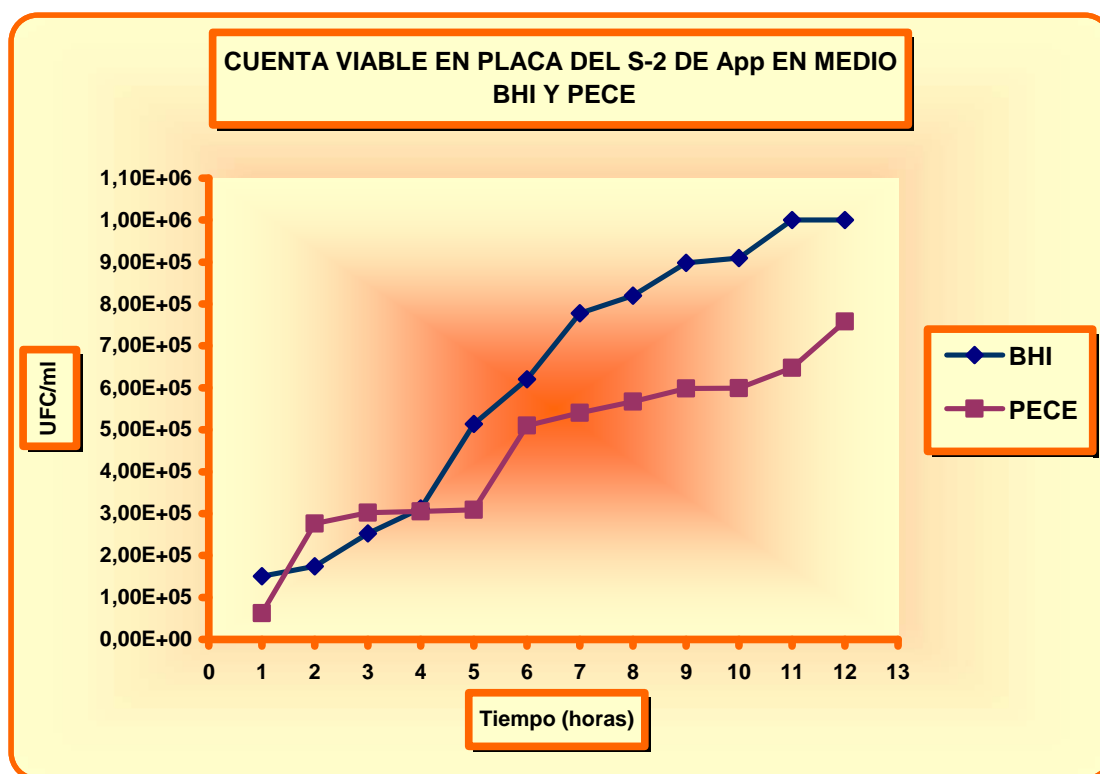


Gráfica 11. UFC / ml del S-1, del caldo BHI y PECE, durante un período de doce horas.

En las últimas tres horas en PECE y BHI, las placas presentaron un crecimiento masivo, el cual limitó su conteo y en el **Gráfico 11** se denota como los puntos más altos, estos con un valor de referencia de 1, 000,000 UFC/ml.

7.4.2 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 2 en BHI y PECE.

En este serotipo se guarda una relación muy estrecha a lo sucedido en el gráfico de la curva de crecimiento. En BHI se muestra un mejor desarrollo y formación de UFC/ml. Con excepción de la hora dos y tres, en donde PECE tuvo su mejor desarrollo. Posterior a estas horas en BHI se mostró un aumento en la formación de colonias del período de la segunda a la décima hora, en donde pasó de las 253,000 a las 910,000 UFC/ml, en este lapso de tiempo como se observa en el **Gráfico 12**. Para las dos últimas horas las placas mostraba un crecimiento colonial incontable, el cual se representa con un valor de 1, 000,000 UFC/ml. **(Ver Tabla. 25 en el apéndice.)**



Gráfica 12. UFC / ml del S-2, del caldo BHI y PECE, durante un período de doce horas.

Para el caso de PECE mantuvo una producción más conservadora en donde después del parámetro citado en el párrafo anterior la obtención de UFC/ml, tuvo variación de 10,000 a 100,000 unidades lo que conlleva a que el valor más alto reportado sea de 758,000 UFC/ml; que en comparación con lo sucedido en BHI esta cantidad se acerca aproximadamente a la que dio en la hora siete.

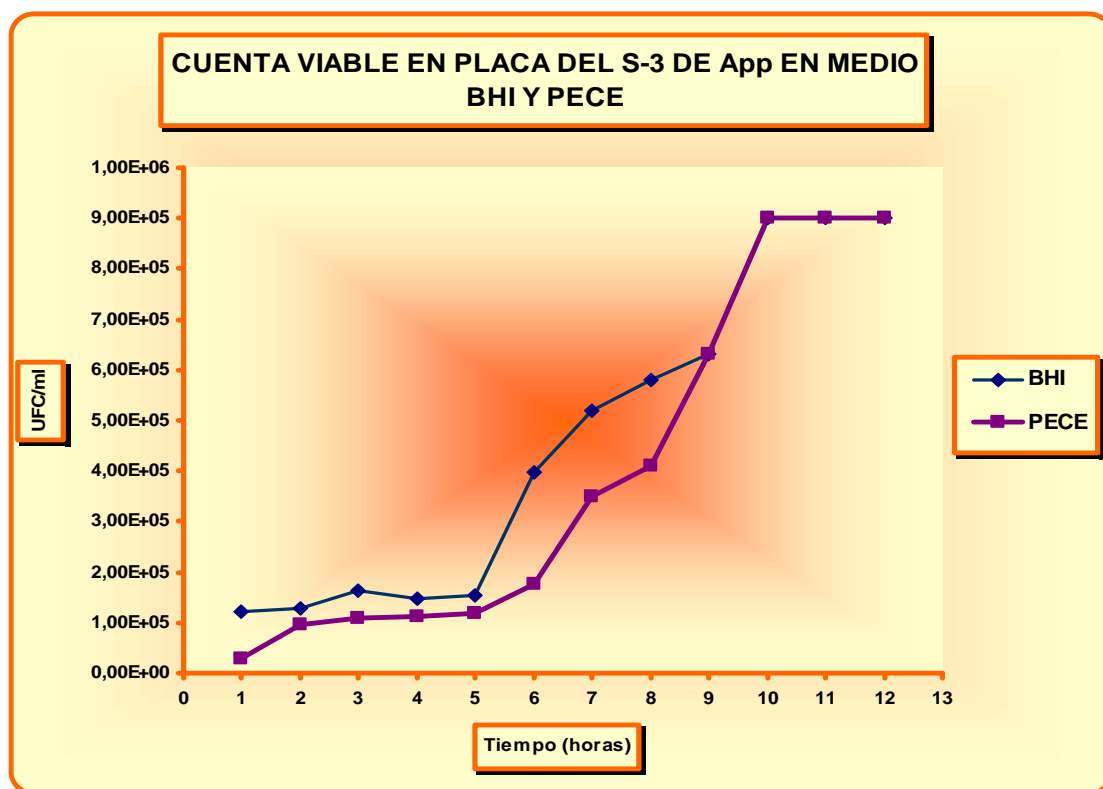
7.4.3 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 3 en BHI y PECE.

En el **Gráfico 13** se representa las UFC / ml del S – 3, el cual muestra que este se adapta de buena forma en ambos medios, pero el desarrollo en placas de agar BHI / NAD el número de colonias que logra formar es mayor cuando la bacteria crece en el caldo BHI.

Guarda una relación paralela en lo que respectan las cinco primeras horas en PECE y BHI, con UFC/ml que van de las 28,500 – 117,000 y 123,000 - 152,500, valores menores y mayores de cada medio respectivamente durante este período; haciendo evidente una producción paulatina en este lapso de tiempo (**Ver Tabla. 26 en el apéndice.**)

Las siguientes tres horas la formación de colonias en placa fue de mejor modo de las procedían del caldo BHI, mientras que las de PECE se rezagaron un poco; pero ya para la novena

hora las UFC/ml de este último, retomaron la misma tendencia de las de BHI. Finalmente para las tres últimas horas fueron incontables en ambos casos con un valor de 900, 000 UFC/ml, tal y como se observa en el **Gráfico 13**.



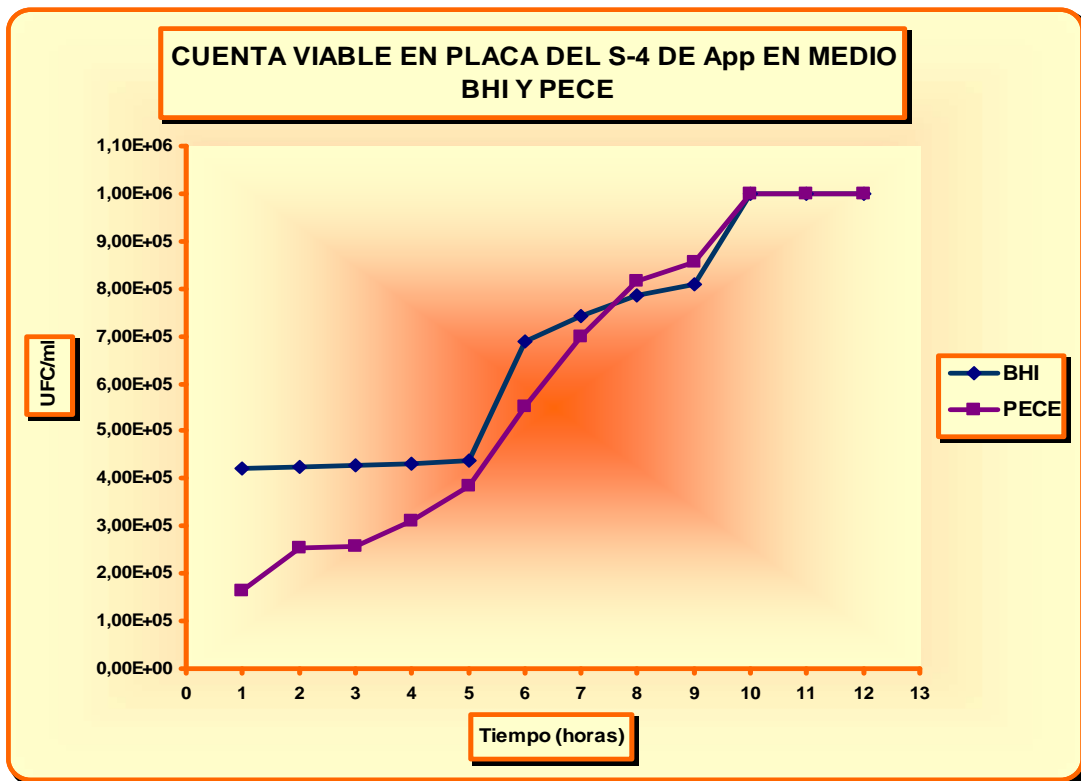
Gráfica 13. UFC / ml del S-3, del caldo BHI y PECE, durante un período de doce horas.

7.4.4 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 4 en BHI y PECE.

Caso parecido al del serotipo anterior pasa con el S-4. En donde se tiene un crecimiento reservado durante las cinco horas iniciales en las cuales BHI brinda mejores condiciones de crecimiento; este medio durante el período indicado denota una linealidad que se hace evidente en el **Gráfico 14**, en donde las UFC/ml van desde las 420,500 a las 438,500. Mientras que para PECE son menores sus valores pero van en ascenso, teniendo como valor en hora cinco de 385,600 y así tener una diferencia de aproximadamente de 50, 000 UFC/ml en este tiempo para ambos medios.

Para las siguientes horas seis y siete el BHI sigue siendo mejor que PECE, pero este último acercándose y conservando los dos la tendencia positiva de desarrollo. Ya para la hora ocho PECE sobrepasa a BHI y así sucede hasta la hora nueve.

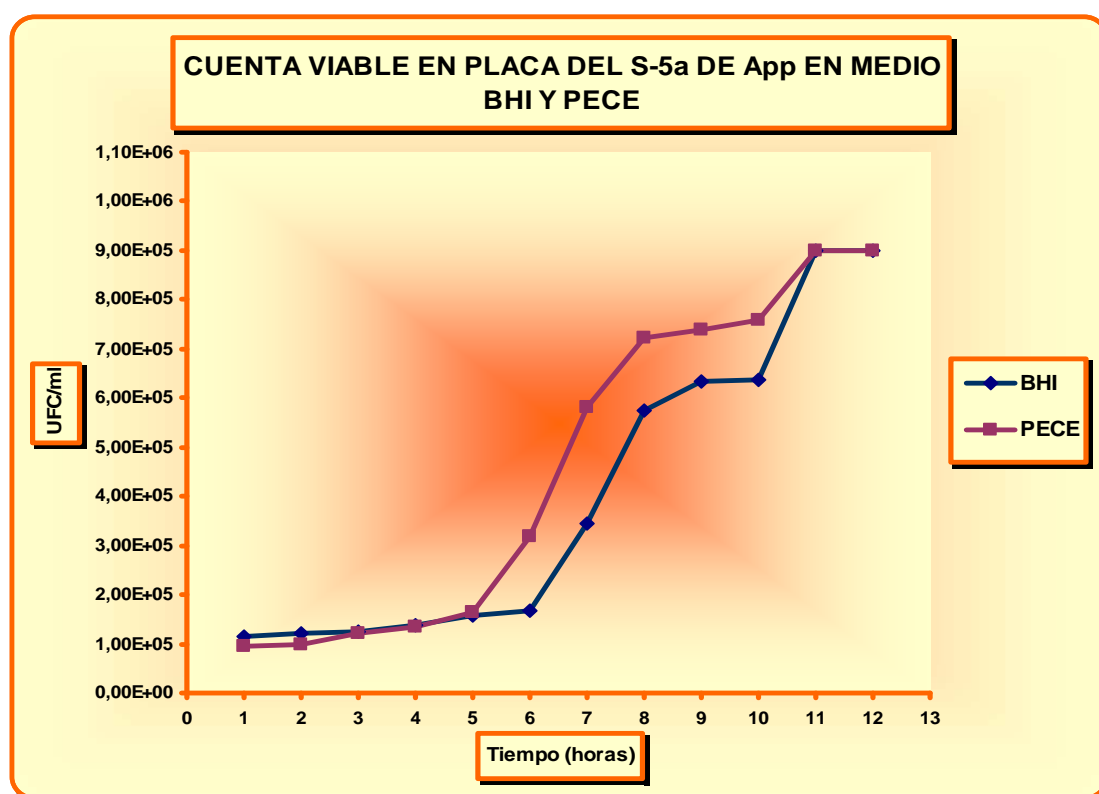
El BHI y PECE tiene valores cuantificables hasta la hora nueve, porque después son incontables en las tres últimas horas con un valor de referencia de 1, 000, 000 UFC/ml.



Gráfica 14. UFC / ml del S-4, del caldo BHI y PECE, durante un período de doce horas.

7.4.5 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 5a en BHI y PECE.

Al observar los puntos del **Gráfico 15**, las UFC/ml del S –1, fueron contables en PECE y BHI hasta la décima hora que comprendió la cinética de crecimiento.



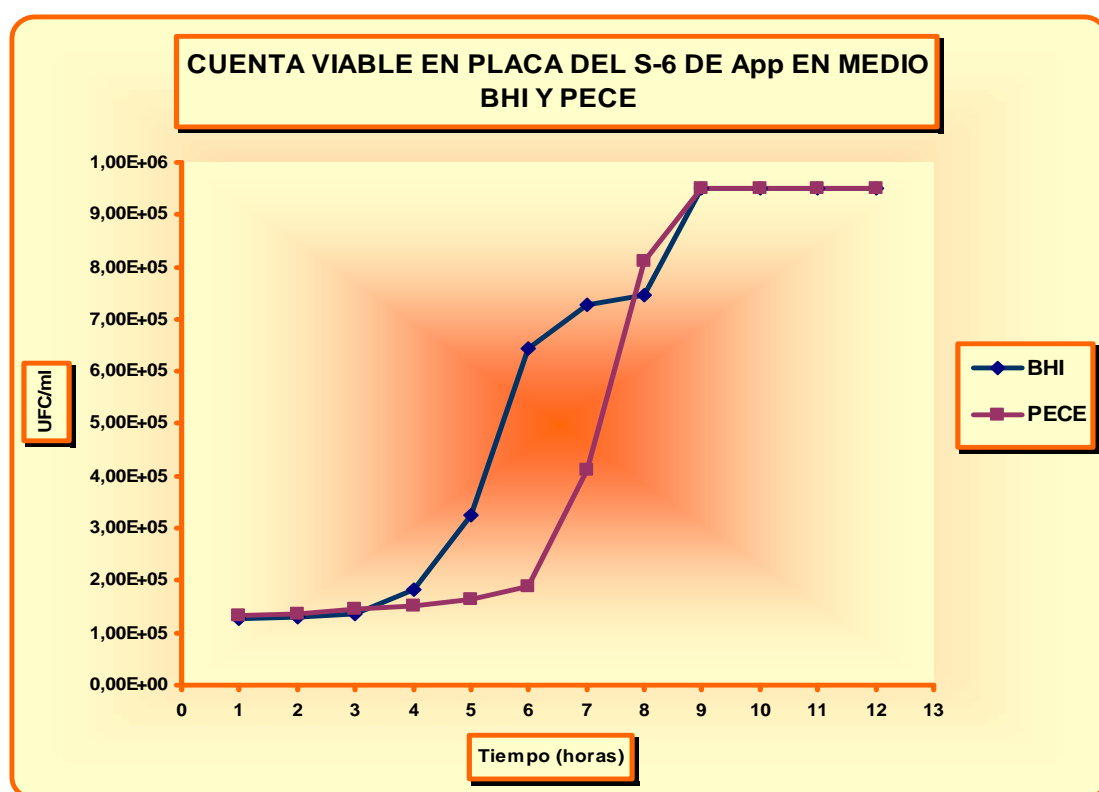
Gráfica 15. UFC / ml del S-5a, del caldo BHI y PECE, durante un período de doce horas.

El S-5a se ve mas favorecido en caldo BHI que en PECE, en las primeras tres horas logrando formar un número mayor de UFC/ml; estos datos aumentaron progresivamente hasta llegar a un valor de 645, 100 UFC/ml en la hora doce. Aquí hay que observar que para BHI cubre un lapso de poca variación en formación de colonias desde la primera hasta la sexta hora con un rango que fue desde 115, 000 a las 168, 500 UFC/ml (**Ver Tabla. 28 en el apéndice.**) Mientras que a partir de esta hora a la ocho es donde se da el mayor desarrollo; después de este tiempo guarda un pequeño lapso de linealidad de la octava a la décima como se denota en el **Gráfico 15**

Para el caso de PECE su mejor desempeño fue de la hora cinco hasta la ocho; en donde la formación de colonias fue en aumento permitiendo ver que este medio le brinda mejor ambiente a la bacteria que BHI, que al igual que este se observa un período de rezago entre la octava y décima hora. Ya para la hora once en ambos casos las UFC/ml se hicieron incontables con un valor de referencia de 900,000 UFC/ml.

7.4.6 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 6 en BHI y PECE.

Las UFC/ml que formó el S-6 se muestran en el **Gráfico 16**, las cuales en las tres primeras horas, los valores más altos fueron para PECE. En el inicio de la hora cuatro y hasta la siete lo anterior se invierte y los datos de UFC/ml formadas son mayores para el BHI. A partir de la hora nueve, en el caso de BHI, se tiene que los valores aumentan en estas últimas tres horas de experimentación y fue posible determinarlos; para PECE y BHI en las cuatro últimas horas del ensayo las UFC/ml fueron incontables.



Gráfica 16. UFC / ml del S-6, del caldo BHI y PECE, durante un período de doce horas.

7.4.7 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 7 en BHI y PECE.

En el **Gráfico 17** se muestran las UFC/ml formadas por el S-7, las cuales, al igual que el serotipo anterior, en las cuatro primeras horas los valores obtenidos fueron mayores para PECE que para BHI. En la hora cinco, las UFC/ml son similares para ambos medios, pero se muestra que de la seis hasta la diez los datos obtenidos son menores para BHI. En las siguientes horas los valores se reportan como incontables para ambos casos, con ayuda del estudio de correlación fue posible determinarlos.

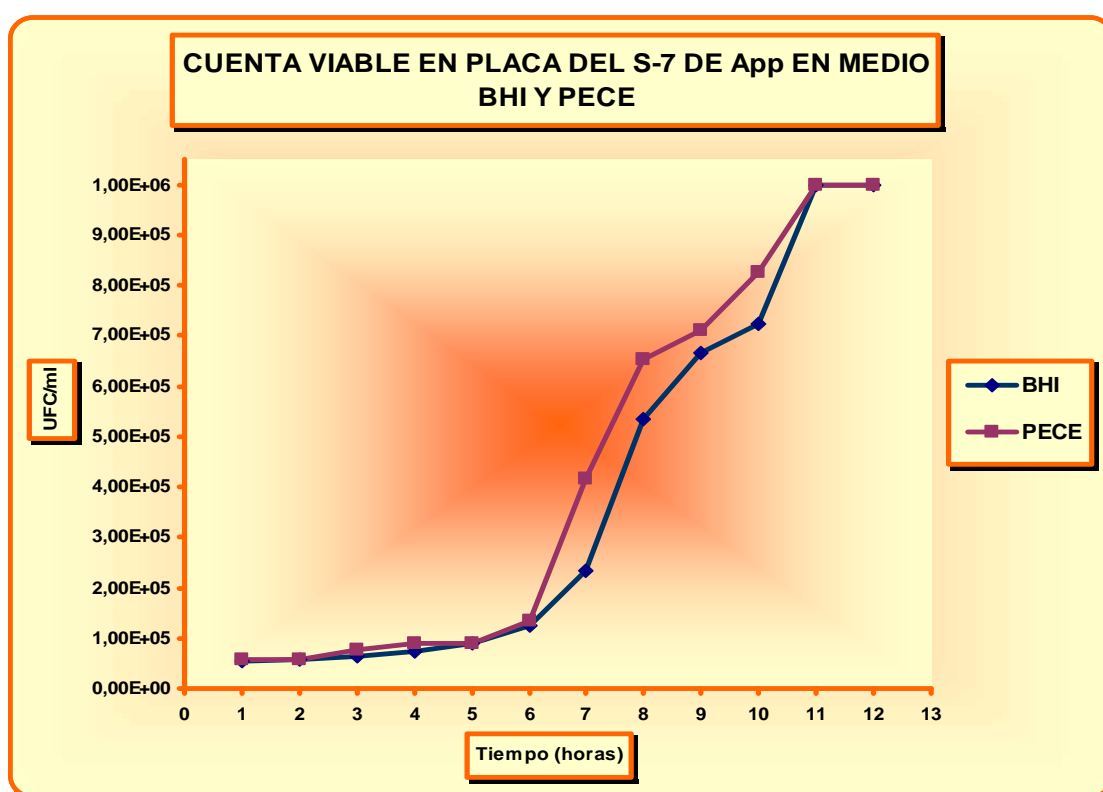


Gráfico 17. UFC / ml del S-7, del caldo BHI y PECE, durante un período de doce horas.

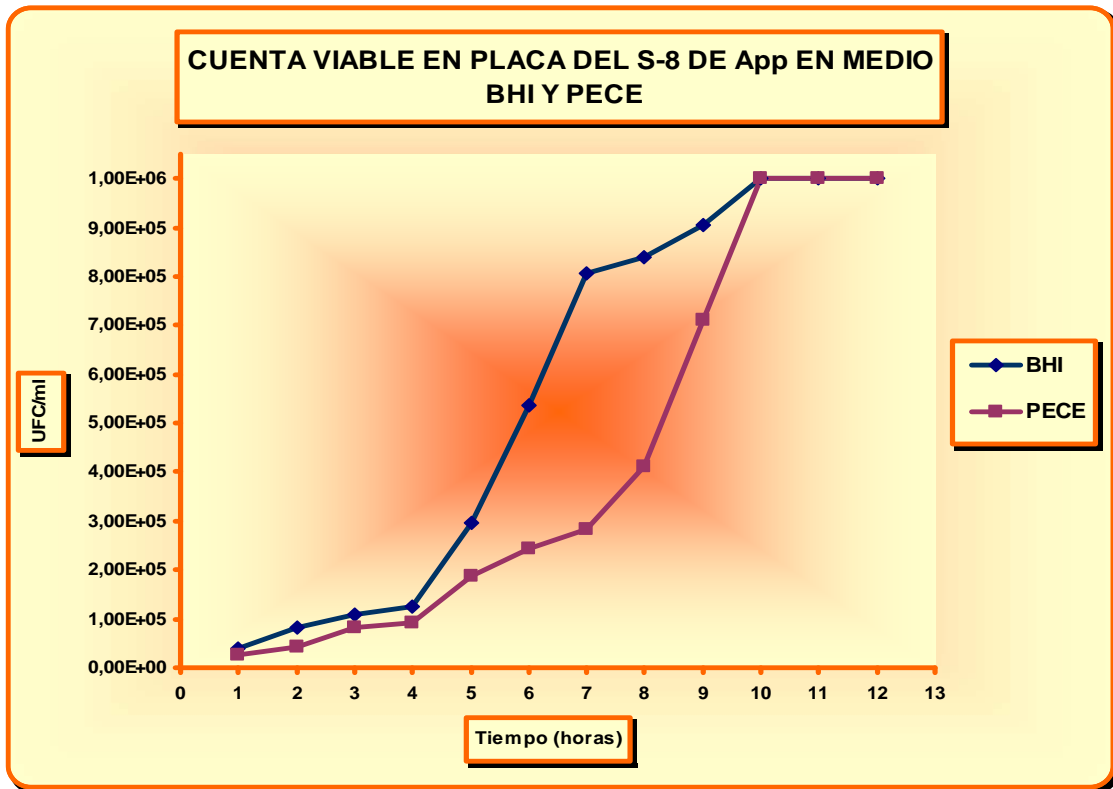
7.4.8 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 8 en BHI y PECE.

El **Gráfico 18** señala que las UFC/ml del S-8 en los medios trabajados, son mayores en las nueve horas en BHI que en PECE. La diferencia que muestran estos valores son muy amplias y nos indica que el S-8 se adecua satisfactoriamente en BHI para desarrollarse que en PECE. Sin embargo, aunque en las siguientes horas las UFC/ml fueron reportadas como incontables, se obtuvieron mediante una correlación.

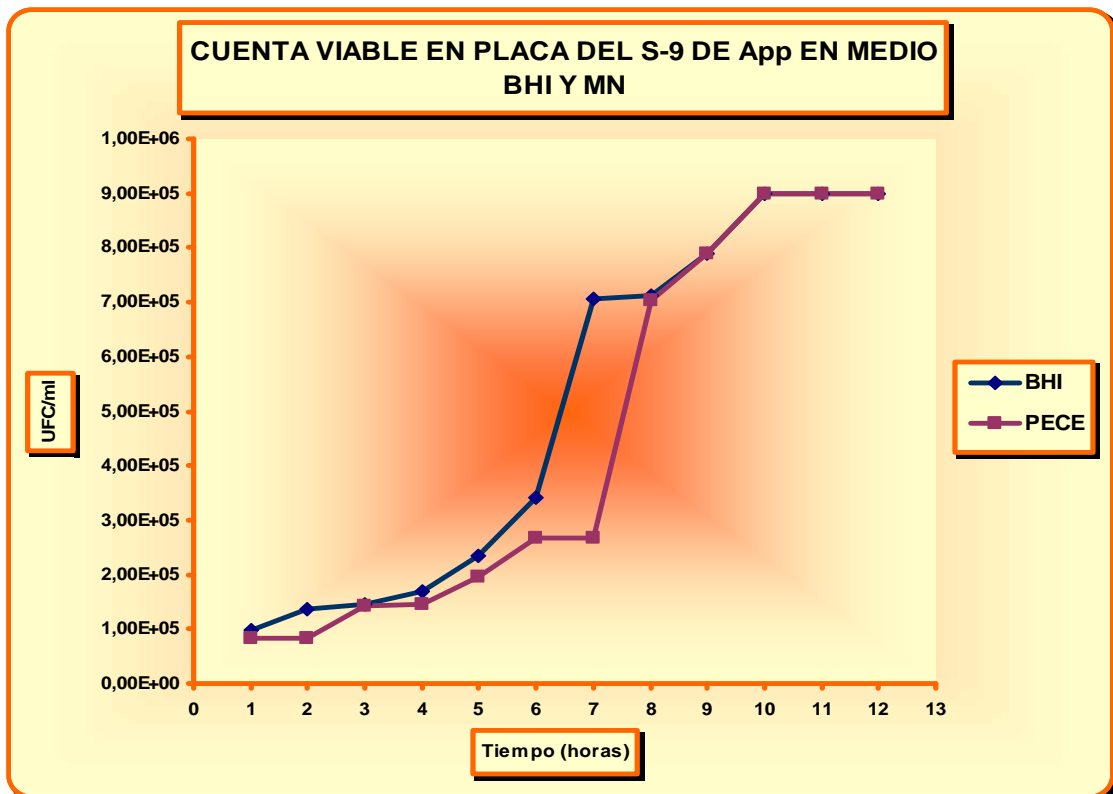
7.4.9 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 9 en BHI y PECE.

La cuenta viable en placa para el S-9 se expresa en el **Gráfico 19**, en el cual, las UFC/ml pudieron ser determinadas hasta la hora nueve. Hasta la hora ocho los datos de UFC/ml se reportaron más altos para el BHI que para PECE. Sin embargo, en la hora nueve prácticamente se obtuvieron el mismo valor.

Las horas siguientes y con ayuda del estudio de correlación, se demuestran con los datos calculados que en este tiempo el caldo PECE supera a BHI.



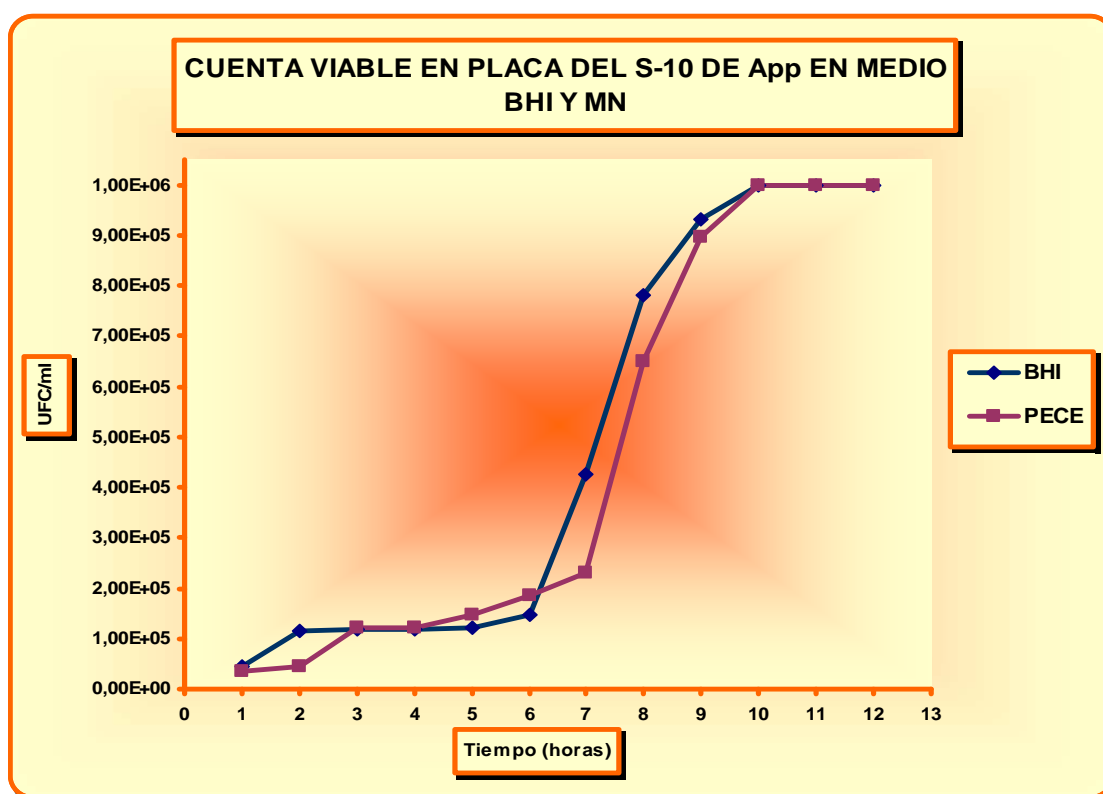
Gráfica 18. UFC / ml del S-8, del caldo BHI y PECE, durante un período de doce horas.



Gráfica 19. UFC / ml del S-9, del caldo BHI y PECE, durante un período de doce horas.

7.4.10 Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del S- 10 en BHI y PECE.

El comportamiento de este serotipo para formar UFC/ml se representa en el **Gráfico 20**, se observa que en las dos primeras horas, los valores obtenidos son más altos para el BHI que para PECE; pero en las siguientes cuatro, lo anterior cambia, siendo ahora los datos superiores para PECE. En las horas siete, ocho y nueve, para BHI y PECE, aún fue posible determinar las UFC/ml, cuyos datos numéricos reflejan que son más altos para el caldo BHI durante este periodo. Continuando con la hora diez, las UFC/ml fueron reportadas como incontables para ambos; sin embargo fueron calculadas con el estudio de correlación; en donde se observa que en estas últimas horas de experimentación el S-10 forma un mayor número de colonias si se desarrolla en PECE.

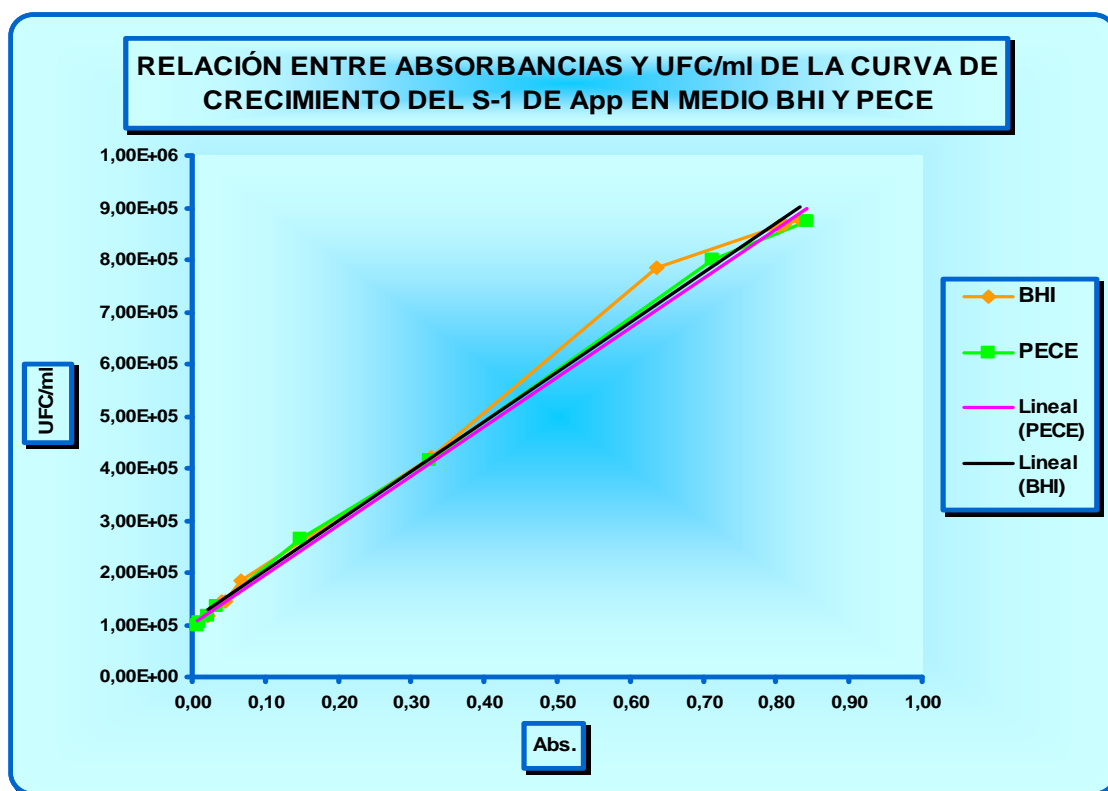


Gráfica 20. UFC / ml del S-10, del caldo BHI y PECE, durante un período de doce horas.

7.5 ESTUDIO DE CORRELACIÓN

7.5.1 Relación absorbancias y cuenta viable del S-1

El **Gráfico 21** muestra la relación existente entre dos variables importantes en este trabajo, como lo es, las absorbancias y las UFC/ml; en donde se pretende determinar la correlación existente entre los valores de estos parámetros. Como se puede observar existen cuatro líneas dos de ellas (la naranja y verde) son para ver el comportamiento de cada uno de los medios; las otras dos líneas (rosa y negra) son de tendencia o regresión lineal, la cual tuvieron que seguir para determinar la mejor concordancia de los datos empleados.



Gráfica 21. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-1 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.

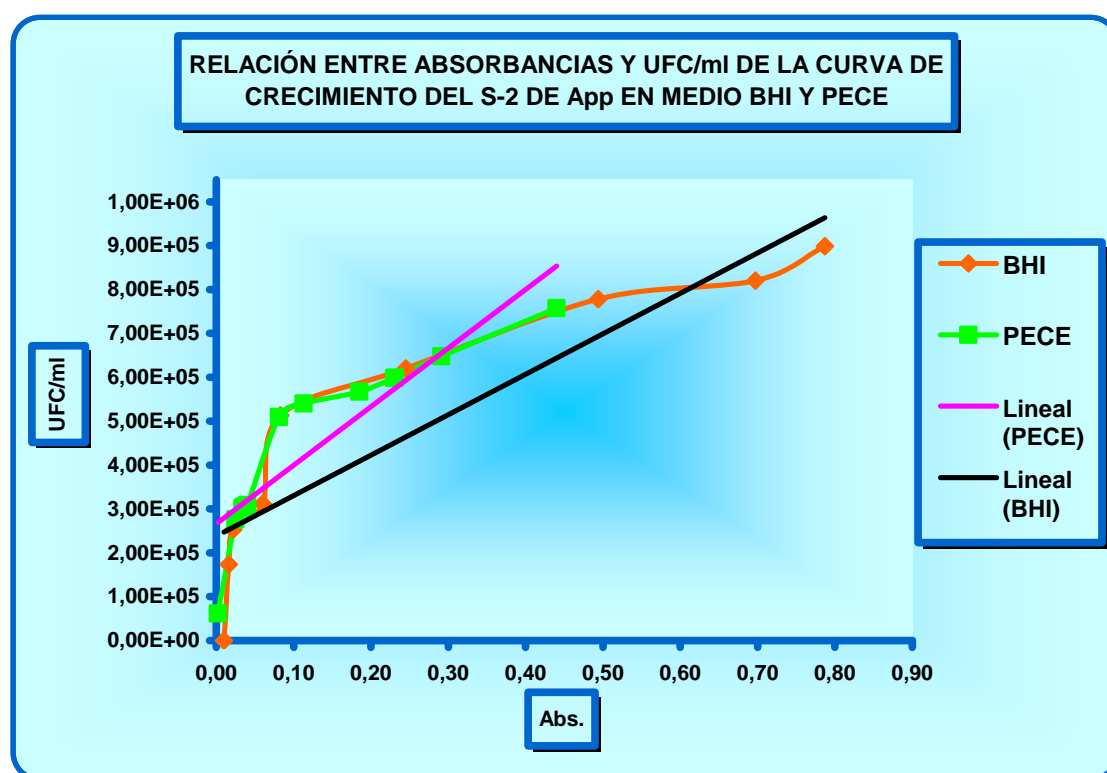
Mostrándose en el caso del S-1 una excelente correlación en los dos medios, que para el caso de BHI tuvo un valor de r : 0.9969 y de r^2 : 0.9939; mientras que para PECE tiene un valor de r : 0.9988 y de r^2 : 0.9976. Al extrapolar las absorbancias que tuvieron valores de UFC/ml incontables, arrojaron los siguientes resultados:

BHI		PECE	
Abs.	UFC/ml	Abs.	UFC/ml
0,845	915,429	0,848	905,528
0,881	949,720	0,874	930,213
0,896	964,008	0,906	960,594

7.5.2 Relación absorbancias y cuenta viable del S-2

El comportamiento de este serotipo refleja en la correlación obtenida la falta de relación entre los datos expuestos, tal como puede observarse en el **Gráfico 22**. Con un valor de r : 0.9322 y de r^2 : 0.8688 en el caso de BHI; para PECE los valores de r : 0.8928 y r^2 : 0.7973. En el caso de las UFC/ml incontables que solo fueron para BHI se expresan los valores desconocidos en la siguiente tabla:

BHI	
Abs.	UFC/ml
0,96	1,086,216
0,97	1,094,404

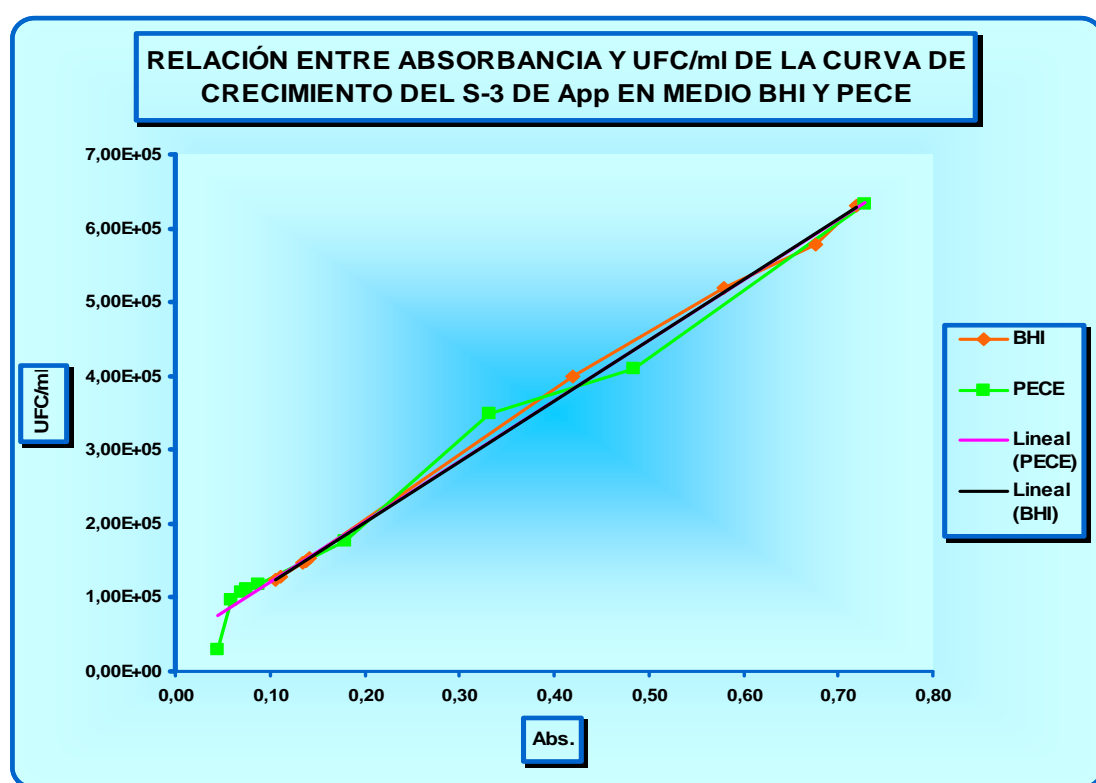


Gráfica 22. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-2 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.

7.5.3 Relación absorbancias y cuenta viable del S-3

En este caso el comportamiento del serotipo fue el más idóneo, dado a los valores obtenidos de correlación, la cual fue excelente, tal como se observa en el **Gráfico 23**, en donde las líneas de tendencia se empalman y es difícil distinguir entre una y otra. Con la extrapolación de los datos graficados de los dos medios, los valores de las UFC/ml incontables reflejan los siguientes valores:

BHI		PECE	
Abs.	UFC/ml	Abs.	UFC/ml
0,732	638,802	0,749	650,142
0,741	646,191	0,784	678,719
0,75	653,581	0,786	680,352



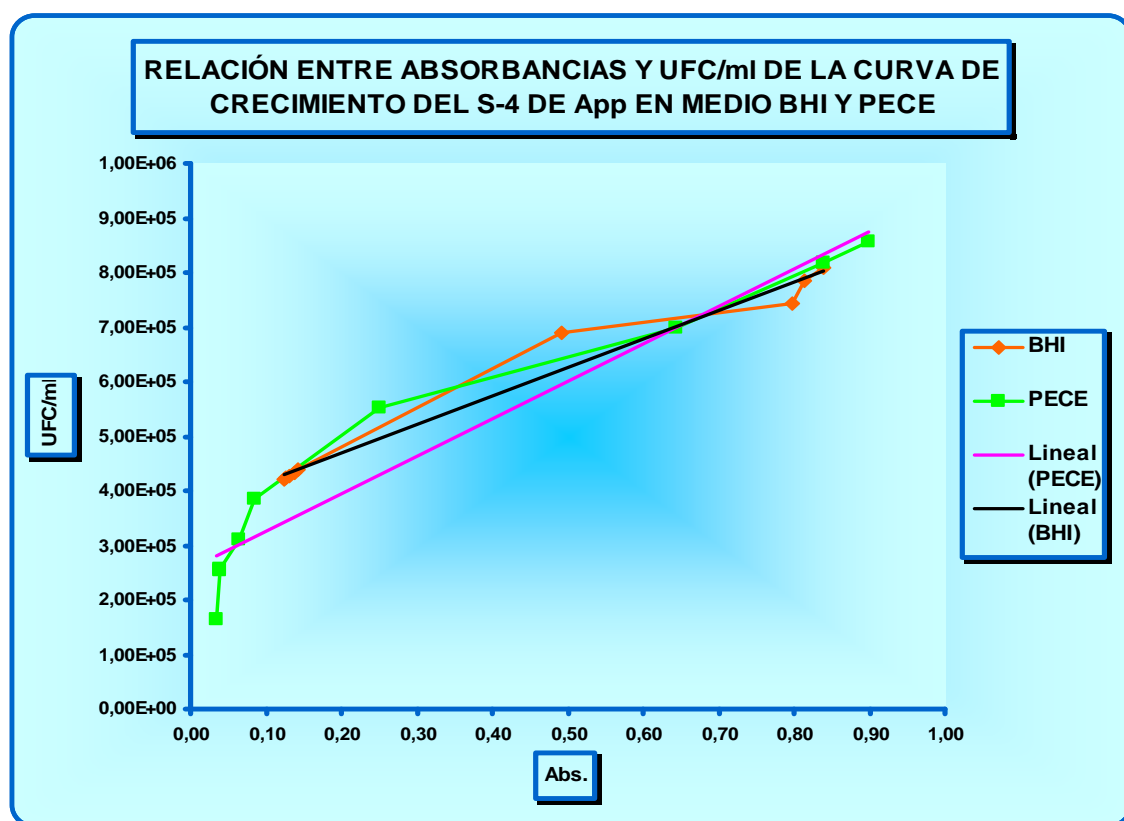
Gráfica 23. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-3 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.

7.5.4 Relación absorbancias y cuenta viable del S-4

En el **Gráfico 24** se muestra la buena correlación de los medios trabajados, siendo para BHI mejor esta con valores de r : 0.9869 y r^2 : 0.9740, denotándose que en los datos aproximadamente de 0.5 y 0.8 de absorbancia son los puntos donde se pierde un poco la linealidad. Para PECE se obtuvieron resultados de r : 0.9667 y r^2 : 0.9345, teniendo su problema en el lapso de 0.1 a 0.6.

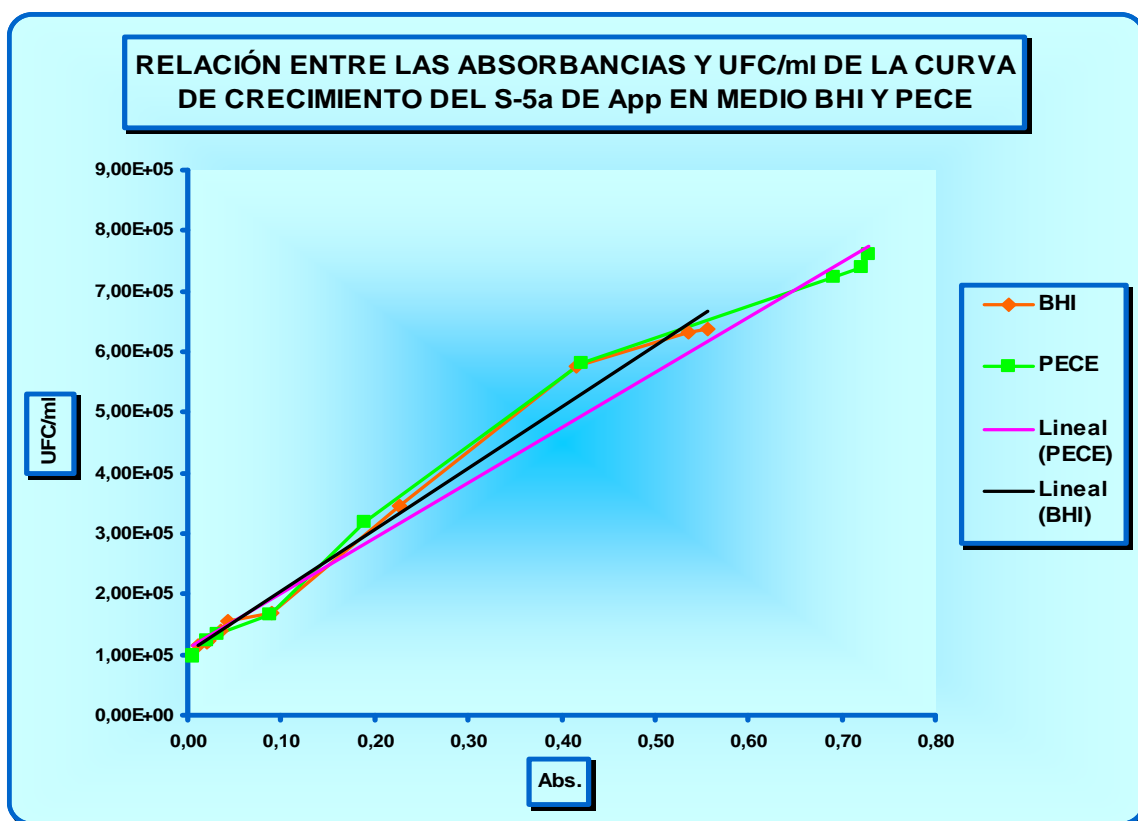
En lo que respecta a placas que fueron incontables mediante el gráfico de correlación se pudo obtener un valor numérico posible el cual respalda a las tres últimas absorbancias que cada medio y se ejemplifican a continuación:

BHI		PECE	
Abs.	UFC/ml	Abs.	UFC/ml
0,856	812,601	0,905	878,869
0,869	819,392	0,91	882,316
0,895	832,973	0,916	886,452



Gráfica 24. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-4 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.

7.5.5 Relación absorbancias y cuenta viable del S-5a.



Gráfica 25. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-5a en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.

En el caso del **Gráfico 25** la correlación mostrada es excelente, siendo mejor para el medio BHI que para PECE, obteniéndose los siguientes datos: r : 0.9950 y r^2 : 0.9900, para el primer caso y r : 0.9923 y r^2 : 0.9846 para el segundo medio. Con respecto a los valores incontables de las dos últimas horas, mediante la extrapolación se lograron determinar y la resultante es el siguiente:

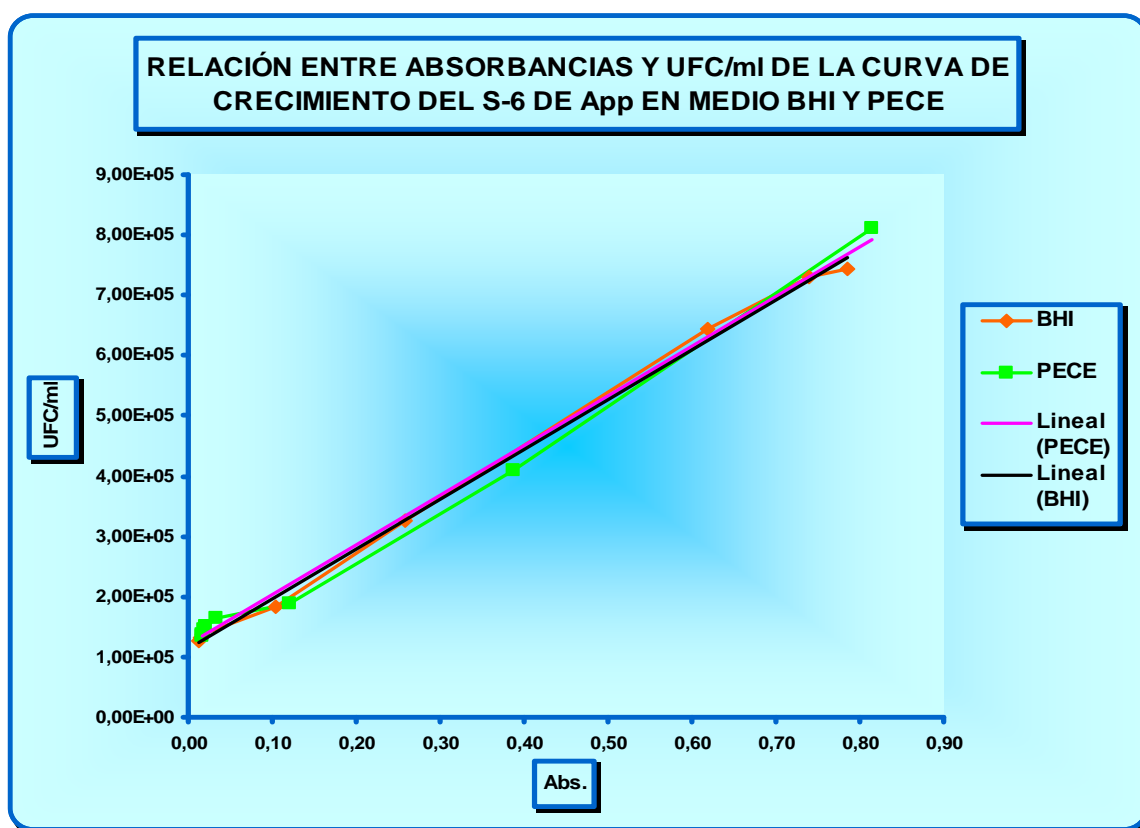
BHI		PECE	
Abs.	UFC/ml	Abs.	UFC/ml
0,573	682,558	0,729	774,278
0,578	687,608	0,766	808,016

7.5.6 Relación absorbancias y cuenta viable del S-6

En el estudio de correlación se determinaron los datos de UFC/ml incontables y se muestran en la tabla siguiente. Los valores obtenidos a estas horas de la curva de crecimiento son menores para BHI que para PECE.

BHI		PECE	
Abs.	UFC/ml	Abs.	UFC/ml
0,802	775,955	0,911	871,750
0,812	784,195	0,931	888,226
0,826	795,730	0,944	898,935
0,84	807,266	0,96	912,116

Además, este estudio nos demuestra que el S-6 se desarrolla en ambos medios de forma similar que en BHI (**Gráfico 26**). Las r obtenidas fueron: para BHI $r = 0.9989$ y $r^2 = 0.9979$ y para PECE: $r = 0.9965$ y $r^2 = 0.993$.



Gráfica 26. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-6 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.

7.5.7 Relación absorbancias y cuenta viable del S-7

La relación del comportamiento del S-7 en ambos medios de cultivo se refleja en el **Gráfico 27**, se observa que no tuvieron la tendencia lineal esperada, pero PECE fue el que más se acercó con un valor de $r = 0.9704$ y $r^2 = 0.9417$; mientras que para BHI $r = 0.9661$ y $r^2 = 0.9333$. Con el empleo de la línea de tendencia o regresión se determinaron los valores incontables de la hora once y doce que se mostraba en el gráfico de cuenta viable para este serotipo y a continuación se citan:

BHI		PECE	
Abs.	UFC/ml	Abs.	UFC/ml
0,66	939,059	0,835	984,785
0,761	1,069,846	0,844	994,381

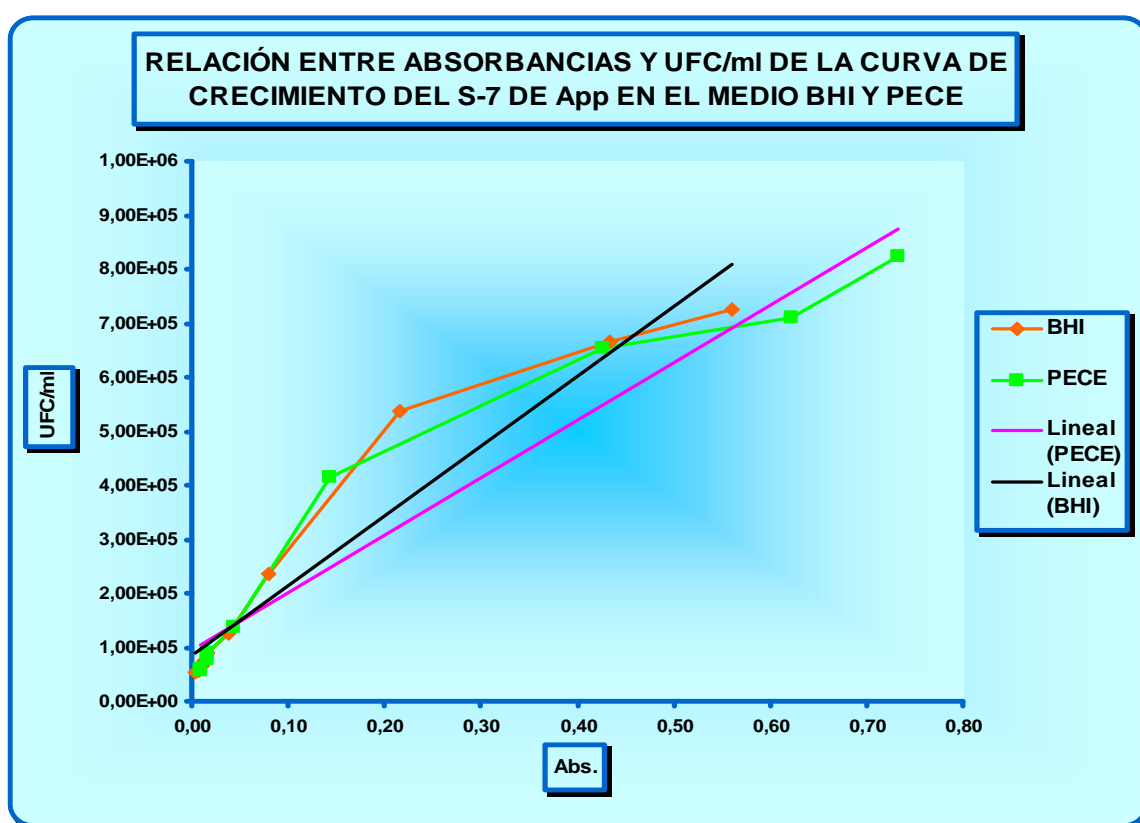


Gráfico 27. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-7 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.

7.5.8 Relación absorbancias y cuenta viable del S-8

En el **Gráfico 28** se demuestra que el S-8 tiene un desarrollo adecuado en ambos medios de cultivo. El comportamiento que manifiesta la línea que representa a BHI es casi lineal con una $r = 0.9951$ y $r^2 = 0.9902$; mientras que para PECE esto disminuye obteniéndose como $r = 0.9834$ y $r^2 = 0.9670$. Los valores incontables de placa con el estudio anterior arrojó los siguientes resultados.

BHI		PECE	
Abs.	UFC/ml	Abs.	UFC/ml
0,834	909,394	0,732	794,724
0,843	918,448	0,76	822,497
0,844	919,454	0,76	822,497

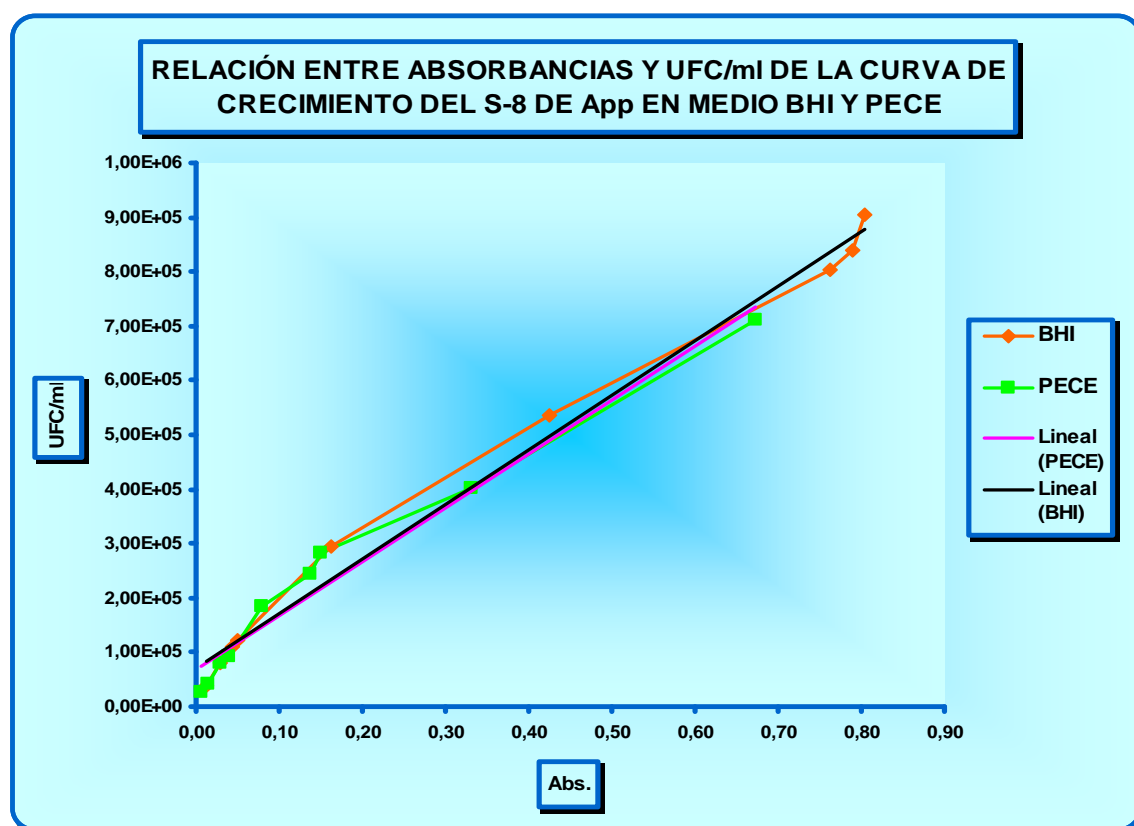
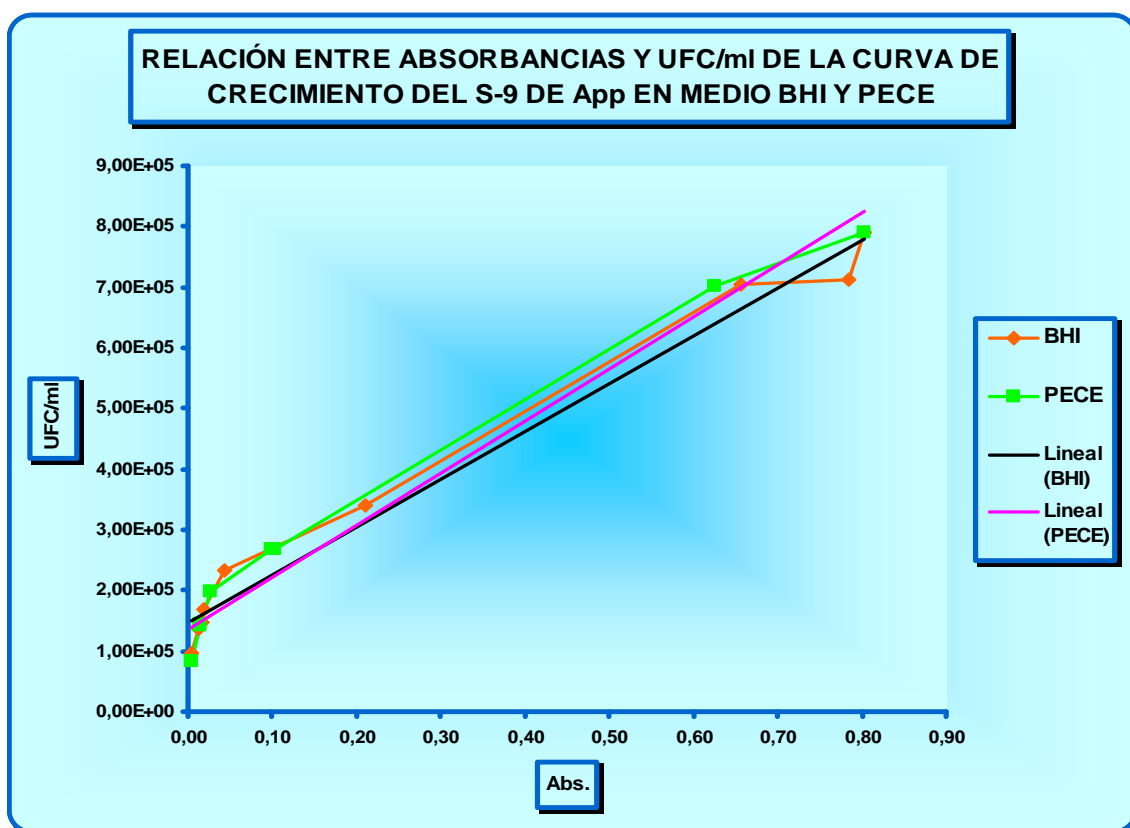


Gráfico 28. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-8 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.

7.5.9 Relación absorbancias y cuenta viable del S-9



Gráfica 29. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-9 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.

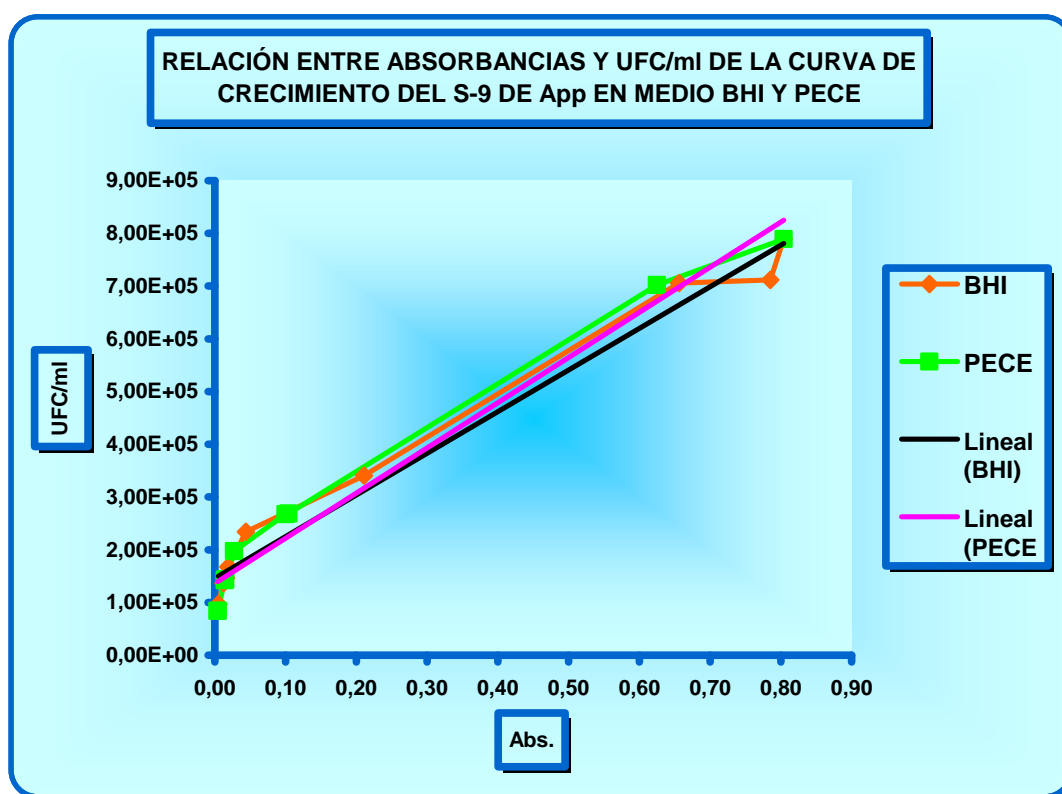
Al observar el **Gráfico 29** se tiene que la linealidad de ambos medios es satisfactoria, lo cual se demuestra con los valores de r . Para BHI se obtuvo una $r = 0.9908$ y $r^2 = 0.9818$ y en el caso de PECE $r = 0.98752$ y $r^2 = 0,9752$. En el caso de las UFC/ml que fueron incontables con el estudio de correlación, en donde se extrapolaron las absorbancias de las horas que tuvieron esta cuestión y se obtuvieron los números siguientes:

BHI		PECE	
Abs.	UFC/ml	Abs.	UFC/ml
0,841	809,686	0,863	875,406
0,853	819,154	0,874	884,828
0,866	829,410	0,885	894,250

7.5.10 Relación absorbancias y cuenta viable del S-10

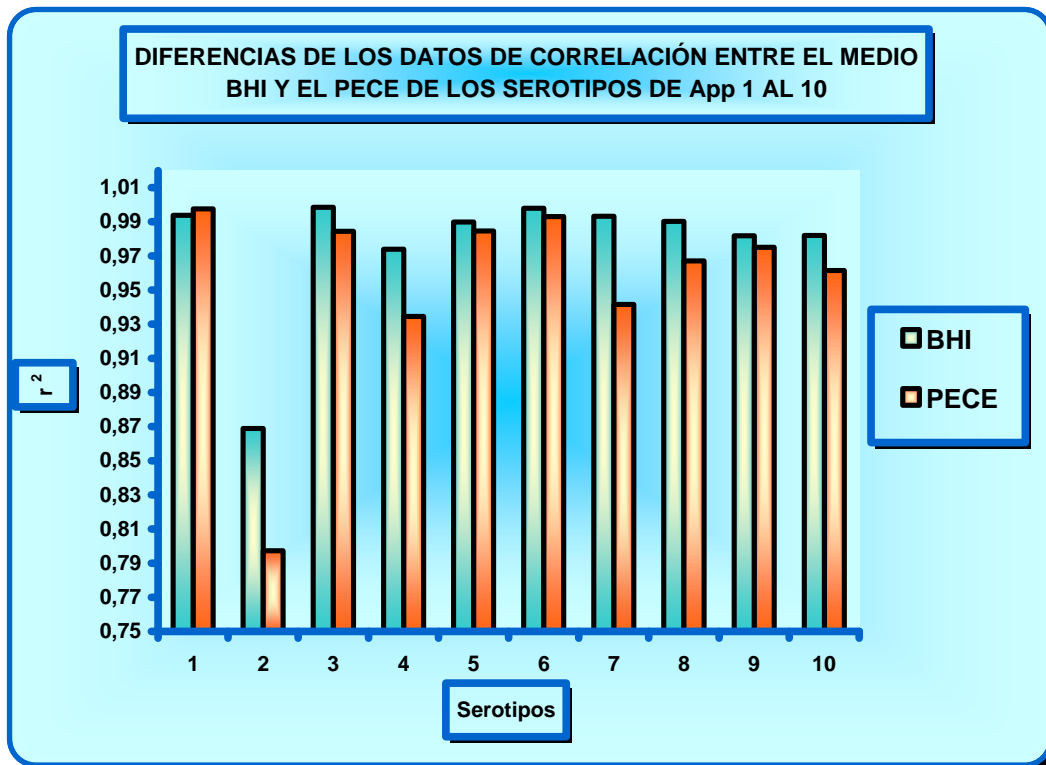
El **Gráfico 30** demuestra que BHI se acercó más a comportarse linealmente que PECE y esto se corrobora con los valores de r obtenidos. Para BHI se calculo una $r = 0.9908$ y una $r^2 = 0.9818$ y para PECE la $r = 0,9875$ y $r^2 = 0,9752$. Para las placas incontables se citan los valores que al extrapolar el **Gráfico 30**, se obtiene las cantidades más grandes de UFC/ml de todas las cuentas viables, tal y como se puede observar en la tabla.

BHI		PECE	
Abs.	UFC/ml	Abs.	UFC/ml
0,961	1,021,541	0,904	1,005,314
0,971	1,031,027	0,978	1,079,036
0,981	1,040,514	0,983	1,084,017



Gráfica 30. Relación entre Absorbancias y UFC/ml del desarrollo del S-10 en medio BHI y PECE, con sus respectivas líneas de tendencia o regresión lineal.

En **Gráfico 31** se presentan los valores obtenidos de r^2 . Se observa que no hay diferencia significativa entre estos datos para los serotipos 1 y 6, los cuales se acercaron al valor de 1. Mientras, que el resto de los serotipos fueron alejándose del valor mencionado de la siguiente forma: (S-3, S-5a), (S-9, S-10, S-8), (S-4, S-7) y (S-2), este último es el que pésima concordancia de variables tuvo.



Gráfica 31. r^2 obtenidas en el estudio de correlación entre absorbancias y UFC/ml de los serotipos de App 1 al 10 en los medios BHI y PECE.

8. DISCUSIÓN

Las EET son enfermedades raras, con periodos de incubación largos (meses a años), que afectan al sistema nervioso central y progresan lentamente hasta la muerte del enfermo. En los animales, la EET más conocida actualmente es la EEB o "mal de las vacas locas", causada por un agente proteico denominado prion, el cual se aloja en los piensos alimenticios que infecta al animal al consumirlos, provocando que en un futuro al emplear los órganos (SN) de este para fines de elaboración de productos biológicos, puedan contaminarlos.

En países libres de EEB, se restringen las importaciones de dichas sustancias, con el fin de prevenir una diseminación mundial y permitir que en las zonas con focos de infección se elimine en su totalidad dicha enfermedad.

En la lucha de erradicar este problema, se buscan opciones para sustituir a los componentes de origen bovino que son parte de las formulaciones de ciertos reactivos, como lo es el caldo BHI, el cual, es utilizado en la elaboración y aprobación de la bacterina que actúa contra la PCP.

Y es por esto que se probó si el nuevo medio (PECE) diseñado hace crecer a diez serotipos de *App* 1-10, comparándolo con el caldo BHI.

En el **Gráfico 1** se observa que ambos medios favorecen el desarrollo del S-1 de *App*. En las primeras horas, donde se lleva a cabo la fase lag y exponencial, el crecimiento de este serotipo es mayor para BHI; pero, a partir de la hora nueve PECE alcanza absorbancias similares. Todo esto, nos hace referencia a que *App* en el medio a probar se desarrolla más lentamente en las primeras fases de la curva de crecimiento; pero, al final del experimento incrementa la producción de bacterias, alcanzando un comportamiento parecido al que logra en BHI.

Las UFC/ml representadas en la **Gráfica 11** muestran que el S-1 es capaz de desarrollarse en ambos medios de cultivo y formar cierto número de colonias; de las cuales, el serotipo logró generar al crecer en BHI, una cantidad mayor hasta la novena hora de la curva de crecimiento, en comparación con PECE, el cual lo alcanza en esa hora y para las últimas tres se hacen incontables, para ambos sistemas. Pero, de la cuarta a la séptima hora, el S-1 fue capaz de aprovechar de mejor forma los factores que proporciona el BHI para incrementar satisfactoriamente el número de bacterias; mientras que para PECE fue de la quinta a la novena hora.

Si bien con lo anteriormente citado, da reflejo que para este serotipo la formulación de PECE la va empleando de una forma más reservada a comparación del BHI, pero en la parte final de la cinética de crecimiento el ambiente para la bacteria se torna similar en los dos medios, permitiendo obtener valores de UFC/ml casi similares en la hora hasta donde fueron contables las placas.

En el caso de todas aquellas horas en donde se presentaron valores de UFC/ml incontables, se manejo el paquete estadístico de Microsoft Excel, el cual no solamente sirvió para determinar un valor aproximado para estas incógnitas; sino que también se pudo establecer la relación existente entre las absorbancias obtenidas y las UFC/ml de las cuentas viables, de cada serotipo.

Empleando el estudio de correlación se logró hacer evidente que tanta concordancia existía entre estas dos variables, esto fue posible empleando la línea de tendencia o regresión mediante la obtención de los valores de r y r^2 ; que permitieron ver que tan significativo fue el estudio para cada serotipo.

Con lo que respecta al S-1 es uno de los dos serotipos que mayor significancia tuvo en la relación de las variables trabajadas, tal y como se observo en la **Gráfica 21**, ambos medios presentaron un comportamiento casi lineal, con unas pequeñas variaciones, en el caso de BHI en el rango de absorbancias de 0.60 – 0.70 y para PECE de 0.10 – 0.20; que finalmente no fue representativo. Para los dos medios se tuvieron valores de r y r^2 de 99% que respalda lo anteriormente citado.

Con la extrapolación de las absorbancias de las tres últimas horas se determino un valor aproximado de UFC/ml, que permite ver que se obtienen datos casi similares y cerca del 1, 000,000 de UFC/ml para los dos medios.

Aparentemente, el S-2 en las tres primeras horas al crecer en PECE, tiene un comportamiento parecido al que ofrece en el caldo BHI; pero, en las horas siguientes, el rango de aumento de las absorbancias es muy pequeño, indicándonos que este serotipo si se desarrolla pero más lentamente que en BHI. Además, en ninguna de las dos curvas de crecimiento se aprecia la fase estacionaria, por lo que es recomendable aumentar las horas de experimentación para determinar si en algún momento el comportamiento del S-2 en PECE iguala al que tiene en BHI. Este serotipo es el que refleja la peor conducta en comparación a los demás.

Fue posible determinar las UFC / ml hasta la hora diez para BHI, lo contrario en PECE fueron contables durante las doce horas. El S-2 presentó un comportamiento diferente al resto de

los serotipos, con respecto a la cuenta viable. En la hora dos y tres, si se compara con PECE, al desarrollarse en BHI, formaron un número menor de colonias; lo cual, nos proporciona información de que en estas horas de experimentación, el S-2 se adapta mejor a desarrollarse en PECE; sin embargo, en la hora cuatro, el BHI lo supera continuando así hasta el final de la curva de crecimiento.

En las últimas dos horas fueron incontables para BHI; las cuales, en el aproximado que se obtiene con la correlación se tienen valores de UFC/ml que fueron desde las 1, 086,216 a las 1, 094,404 UFC/ml, en las últimas dos horas. Hay que considerar que el S-2 sigue creciendo en PECE, pero, lentamente.

Esto es respaldado con lo que sucedió en el estudio de correlación, el cual no es significativo para ninguno de los dos medios. El **Gráfico 22** denota lo citado, ya que la mayor parte de los valores graficados para BHI y PECE están distantes de la línea de tendencia o regresión, lo que conlleva a tener valores no aceptados de r y r^2 ; por lo tanto, la falta de relación entre los resultados de ambas variables se refleja en lo expresado en cada uno de los tres gráficos que conforman el estudio de este serotipo.

El S-3, al igual que el S-4, el **Gráfico 3 y 4** respectivamente, demuestran una adaptación de crecimiento en ambos medios. Además, observamos que PECE favorece el crecimiento de este serotipo de una manera satisfactoria ya que observando las características de la curva que presenta BHI, PECE en forma constante, logra igualarlas e incluso hasta mejorarlas en las últimas horas del ensayo, consiguiéndose que en ese momento la bacteria supere por una diferencia mínima, los valores obtenidos en BHI; este desarrollo similar solo se manifestó en los gráficos de la curva de crecimiento.

Para el caso de las cuentas viables, a pesar que ambos serotipos tienen formación de colonias cuantificables hasta la novena hora y tendencia de las curvas casi análogas; el serotipo 4 tiene una producción inicial de cuatro veces más en UFC/ml y antes de ser incontables de casi 100,000 UFC/ml, que refleja mayor productividad de este. Para los dos casos, en la décima hora en adelante fueron incontables las colonias presentes en las placas. Y mediante la extrapolación de los valores de absorbancia de las tres horas finales se obtuvieron resultados más satisfactoriamente para el S-4 de hasta 886,452 y para el S-3 de 832,979.

Con el estudio de correlación se denota lo contrario a lo expresado anteriormente, ya que aquí el S-3 es el que mejor concordancia tiene entre las variables y arroja valores de r de 99% y r^2

de 99 y 98% para BHI y PECE respectivamente; teniendo las variaciones en el rango de absorbancia de 0.20 – 0.60 en ambos casos como se muestra en el **Gráfico 23**. Y con lo que respecta al S-4 su relación de variables tiene muchos puntos que están separados de la línea de tendencia o regresión. Este serotipo tuvo mejor correlación para BHI que para PECE, que permite respaldar lo sucedido en el gráfico de la cinética de crecimiento.

En la curva de crecimiento del S-5a (**Gráfico 5**), se manifiesta que este serotipo en PECE y BHI, tiene un comportamiento parecido hasta la hora cuatro; ya que posterior a este tiempo, PECE conforme pasan las horas supera poco a poco al BHI. Para lograr el crecimiento de este serotipo, PECE, esta ampliamente recomendado.

A pesar de tener absorbancias similares en la curva de crecimiento, el **Gráfico 15** de cuenta viable muestra que el BHI, en las primeras cuatro horas de experimentación logra que el S-5a forme un mayor número de UFC/ml; sin embargo, a partir de la hora cinco lo anterior cambia radicalmente, ya que el crecimiento del serotipo en PECE se ve favorecido durante este tiempo hasta la novena hora de la curva de crecimiento; en el caso de BHI la producción se incrementó en el período de la sexta a la novena hora. Presentándose en las últimas dos horas colonias incontables en placa para el BHI y PECE. Con valores aproximados de la extrapolación de casi 800,000 UFC/ml.

Este serotipo muestra en el estudio de correlación una buena concordancia entre las absorbancias y las UFC/ml obtenidas, ya que el comportamiento es casi lineal y es respaldado con los valores de r de 99% y r^2 98% para los dos medios

Como se puede observar tanto en el **Gráfico 6**, el desarrollo de la fase lag o de latencia tuvo mayor duración para PECE, pero las tres primeras horas el desarrollo fue parecido en ambos medios; en el caso de BHI después de este tiempo se inicio la fase exponencial, teniendo una producción considerable en el período de la quinta a la sexta hora, que da a revelar que es cuando mayor aprovechamiento de los nutrientes de BHI tiene el serotipo. Caso que en PECE es notorio en el lapso de la séptima a la octava hora y llevándose este ciclo en un tiempo menor, que hace evidente que el serotipo se adapta de mejor forma a la formulación PECE, tanto en esta etapa como en la estacionaria, en donde a pesar que se inicio en el mismo tiempo para uno y otro medio, el antes citado marca diferencia significativa de más de 0.1 de valor de absorbancia con respecto a lo ocurrido en BHI. Dando pauta de que a pesar del rezago en la obtención del serotipo en la fase inicial por parte de PECE, este posteriormente le da mejores condiciones y mayor rendimiento que BHI.

Lo anteriormente expresado se apoya con lo sucedido en la cuenta viable, en donde se observa que los valores de UFC/ml aumentan conforme avanza el tiempo de contacto de la bacteria con el medio. Igualmente, como se vio en las absorbancias, PECE requiere más tiempo para igualar lo que ofrece el BHI con el S-6. Ya para la hora nueve y en adelante se tuvieron colonias incontables en placa; que con el estudio de correlación se obtuvieron valores para BHI que fueron de 775,955 a 807,266 y para PECE de 871,750 a 912,116.

Para el caso de la concordancia este serotipo al igual que el primero son los que obtuvieron valores más significativos, tal y con lo muestra el **Gráfico 26** en donde la tendencia para los dos medios es casi lineal con respecto a la línea de referencia, y resultaron valores de r y r^2 de 99%, que corroboran lo mencionado.

Este serotipo es un caso especial, dado que, solo se manifestaron dos de las tres etapas que estuvieron en estudio; ya que careció de fase estacionaria que si se manejase una curva de crecimiento de un período de quince a dieciocho horas, se podría determinar que medio logra el mejor desempeño del serotipo. Lo que hay que resaltar es que la tendencia de desarrollo del serotipo es paralela en ambos medios, esto se ve reflejado en el **Gráfico 7** en el cual el período de latencia para BHI y PECE se da hasta la sexta hora, en donde las variaciones son bajas; después de esta hora inicia la etapa exponencial la cual es más redituable para PECE, dando una producción considerable que hace que se tenga un mejor ambiente para el serotipo en este medio a discrepancia de BHI.

Ambos medios de cultivo favorecen el desarrollo de colonias, al igual que sucede con la curva de crecimiento, PECE supera los valores de BHI, indicándonos que el S-7 se adapta más rápidamente en crecer en este medio, desde un inicio hasta décima hora, en donde para ambos casos fueron incontables. En el estudio de correlación se obtuvieron valores máximos de 1,069,846 para BHI y 994,381 para PECE de UFC/ml. En el caso de la relación entre absorbancias y UFC/ml, no fue de lo más idóneo, ya que se tiene puntos que están alejados de la línea de tendencia o regresión, teniendo valores de r de 97% y 96% para BHI y PECE respectivamente; lo que permite hacer notar la falta de concordancia de las variables.

En este caso a diferencia de los tres últimos serotipos mencionados, aquí el que mejor disposición para la evolución del S-8 entre cada una de las horas trabajadas, fue BHI de inicio a fin. En la primera fase ambos medios muestran la tendencia de crecimiento de forma paralela hasta la cuarta hora, después de este tiempo BHI marca diferencia, presentando un rendimiento superior a PECE y llevando el cambio de los siguientes períodos en un lapso menor. Hay que

recalcar que de la sexta a la novena hora es cuando el serotipo tiende a aprovechar mejor los nutrientes de los medios en cuestión, tal y como se observa en el **Gráfico 8**.

Esto se complementa con lo obtenido en la cuenta viable para este serotipo, dado que, BHI da mayores UFC/ml que PECE, en todas las horas de la curva. La diferencia de los valores manifiesta que el S-8 se adapta mas adecuadamente a los nutrientes de BHI, sin dejar de mencionar que si se desarrolla en PECE pero mas lentamente. Esto se da hasta novena hora por que después de este tiempo las placas fueron incontables; y la mejor disposición del BHI para el desarrollo del S-8 se reforzó con la determinación de estos valores mediante la extrapolación de las absorbancias en la curva de correlación, que dieron valores aproximados de hasta 919,454 para BHI y 822,497 para PECE.

Con lo que respecta al estudio de correlación el BHI es el que tuvo mejor concordancia de variables con valores de r y r^2 de 99% que refleja casi la linealidad de la curva de BHI; caso que no es así para PECE ya que tuvo valores de r y r^2 no tan excelentes como los del otro medio, pero que permiten que las muestras trabajadas sean significativas.

El S-9 es uno de los dos serotipos que junto al S-10, emplean de mejor forma los ingredientes de los medios trabajados; dado que guardan una relación muy estrecha de crecimiento durante las doce horas. La fase lag o de latencia se lleva en un período de cinco horas, con mínimas diferencias entre una absorbancia y otra, teniendo como máximo de discrepancia un valor 0.017 entre un medio y otro que realmente no es demostrativo. Las siguientes etapas se llevaron en cuatro y tres horas respectivamente, siendo BHI el que mejores condiciones proporciona al serotipo hasta la hora diez que es cuando PECE supera minimamente a BHI (**ver Gráfico 9**), pero el desarrollo fue excelente en el ambiente proporcionado por los dos.

Nuevamente los datos de las UFC/ml respaldan lo que sucedió en la curva de crecimiento pues los valores obtenidos demuestran que el S-9 logra desarrollarse en ambos medios. En las primeras ocho horas el BHI toma ventaja sobre PECE, pero de la ocho a nueve lo alcanza y la bacteria tiene a comportarse de forma similar en ambos medios; por lo que se tiene, que el S-9 se adapta a crecer en PECE requiriendo más horas de contacto entre el serotipo y los nutrientes que proporciona para obtener resultados similares a los que logran con BHI. En las tres horas finales se hacen incontables las colonias en placa, y pudiendo determinarse con la regresión lineal valores que van desde 809,086 a 894,250 para ambos sistemas.

La correlación en este caso fue mejor para el BHI el cual tiene valores de r y r^2 , que llevan a la curva casi a la linealidad, con respecto a la de referencia; en el caso de PECE tiene datos más dispersos que impiden tener una concordancia excelente.

Finalmente, este serotipo tuvo un comportamiento paralelo en los dos medios de cultivo, en donde la primera etapa es casi lineal en un lapso de seis horas; aunque la conducta sea de esa manera, la tendencia siempre es ascendente. La siguiente fase se llevó a cabo entre tres y cuatro horas, en donde de la séptima a la novena es cuando la bacteria dispara su crecimiento. Ya el período final difiere en una hora como se representa en el **Gráfico 10**, pero la relación entre curvas es muy estrecha y no se puede decretar que medio es el más idóneo; por lo se necesitaría que el tratamiento del S-10 fuese como mínimo de otras tres horas adicionales.

La cuenta viable para este serotipo ocurre en mismo tiempo y comportamiento que lo anteriormente mencionado, la diferencia radica en que los valores de UFC/ml obtenidos cambian constantemente, pues hay momentos en que ambos medios tienen ventaja uno sobre el otro, por lo que se deduce que los dos caldos favorecen la viabilidad y desarrollo del S-10. Y para las últimas tres horas son imposibles el conteo de las placas, dichos valores que no se pueden registrar se pudo tener un aproximado de ellos con la extrapolación de las absorbancias en estas horas y se reportaron los valores de UFC/ml más altos de todos los serotipos y tal como se cito en el apartado del S-10 en los resultados.

Caso parecido para el estudio de correlación tiene este serotipo con el anterior en donde BHI es el que mejor analogía de datos tiene y sus puntos en el **Gráfico 20** se acercan más a los de PECE con respecto a la línea de tendencia o regresión.

Determinar las UFC/ml por la técnica de cuenta viable en placa, en este trabajo, tuvo sus limitaciones ya que principalmente en las últimas horas de la curva de crecimiento se obtuvieron valores incontables, aun realizando diluciones grandes de la bacteria.

En resumen se tiene que:

En general los diez serotipos logran desarrollarse en PECE; sin embargo, los que tuvieron un comportamiento más semejante en los medios de cultivo trabajados, fueron el S-9 y S-10, ya que las tendencias de las curvas fueron casi iguales en ambos casos.

El S-2 aunque creció en PECE en ningún momento del experimento logró igualar y mucho menos superar a lo ocurrido en BHI.

En el caso de los serotipos uno, tres, cuatro y seis, en PECE crecieron más lentamente que en BHI en las dos primeras fases de la curva; sin embargo, la bacteria encuentra las condiciones adecuadas en PECE para comportarse de forma similar o mejor que en BHI, según sea el caso. Por el contrario el S-8, aunque la curva obtenida en PECE sea parecida a la de BHI, App inicialmente consiguió tener un desempeño casi paralelo y en los siguientes ciclos creció en PECE pero no se adaptó como en BHI.

Finalmente, la evolución de los serotipos cinco y siete en PECE logró tener mejor rendimiento que en BHI desde la fase log o exponencial hasta el final del ensayo. Teniendo en cuenta que el S-7 necesita de mayor tiempo para determinar bien sus tres etapas, el S-5a y el S-7 fueron los únicos que adaptaron a crecer de mejor manera en PECE que en BHI.

Con respecto al estudio de correlación los serotipos que excelente concordancia y linealidad, con respecto a la línea de tendencia o regresión de las variables trabajadas son el S-1 y S-6.

Después de estos los que tuvieron muy buena concordancia, con valores de r y r^2 por debajo de los mencionados y linealidad un poco deficiente, son el S-3 y S-5a.

Los que solo para el caso de BHI tuvieron una r^2 de 98 a 99% y de 96 a 97% en PECE son el S-8, S-9 y S-10; quienes tuvieron una buena concordancia en general para ambos medios.

El S-4 y S-7 tiene una mala relación entre absorbancias y UFC/ml y el que si es muy mala la analogía entre las variantes tratadas es el S-2 el cual tiene valores de r y r^2 muy bajos.

9. CONCLUSIONES

- ★ Se logró determinar la eficacia del medio nuevo para todos nueve de los serotipos de *App* que se probaron en este experimento (1 a 10; exceptuado el 2), comparado con BHI por medio de curvas de crecimiento y cuenta viable.
- ★ Se reactivaron diez serotipos de *App*, a partir de criviales con características de pureza e identificación.
- ★ Se logró preparar adecuadamente matraces con caldo BHI y PECE suplementados con NAD (1 μg / ml).
- ★ No existen diferencias marcadas entre BHI y PECE con respecto a la curva de crecimiento y la cuenta viable de nueve de los diez serotipos de *App*; con excepción del serotipo 2.
- ★ Con el uso de PECE en las investigaciones se reducirá y podría llegar a eliminar la diseminación del prion de la EEB causado por la utilización del BHI.
- ★ El estudio de correlación permitió calcular las UFC/ml formadas por los serotipo del 1 al 10 al desarrollarse en los caldos PECE y BHI, que no se pudieron determinar por la técnica de cuenta viable en placa.
- ★ El estudio mencionado permitió ver que serotipos guardaron mejor relación entre las absorbancias y las UFC/ml de las cinéticas de crecimiento de los 10 serotipos.

10. SUGERENCIAS

Es importante que se sigan diseñando productos relacionados con la investigación, que estén exentos en su formulación de ingredientes de origen bovino y así evitar la diseminación de las ET. Una opción es buscar sustituirlos por sustancias que tengan propiedades similares a estos y que proporcionen condiciones más idóneas para la producción de reactivos y biológicos, que permitan economizar tanto costos como tiempo.

Además, podemos citar como otra alternativa para evitar la propagación de la EEB, que países, como México, donde no se han reportado casos de esta enfermedad, puedan exportar productos de origen bovino (como órganos y secreciones sin problemas de infección) u otros animales; que son necesario en la investigación para la elaboración de biológicos.

Las exotoxinas de App también son utilizadas en la producción de bacterinas, se sabe que en BHI la bacteria las libera, por lo tanto se tendrían también que determinar en el medio PECE para darle seguimiento a este trabajo y tener una razón más para emplearlo como alterativa de desarrollo.

11. APÉNDICE

11.1 TABLAS

11.1.1 Curva de crecimiento

ABSORBANCIAS DE CURVA DE CRECIMIENTO DEL S-1 DE App EN MEDIO BHI Y PECE.		
HORA	BHI	PECE
1	0.021	0.008
2	0.040	0.008
3	0.046	0.009
4	0.066	0.022
5	0.327	0.034
6	0.637	0.149
7	0.804	0.326
8	0.811	0.714
9	0.832	0.842
10	0.845	0.848
11	0.881	0.874
12	0.896	0.906

Tabla 14. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-1 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.

ABSORBANCIAS DE CURVA DE CRECIMIENTO DEL S-2 DE App EN MEDIO BHI Y PECE		
HORA	BHI	PECE
1	0,01	0,002
2	0,016	0,025
3	0,022	0,034
4	0,06	0,036
5	0,083	0,04
6	0,245	0,081
7	0,494	0,113
8	0,697	0,185
9	0,787	0,23
10	0,824	0,231
11	0,96	0,291
12	1,058	0,44

Tabla 15. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-2 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.

ABSORBANCIAS DE CURVA DE CRECIMIENTO DEL S-3 DE App EN MEDIO BHI Y PECE		
HORA	BHI	PECE
1	0,105	0,045
2	0,111	0,06
3	0,135	0,07
4	0,139	0,075
5	0,141	0,087
6	0,42	0,179
7	0,58	0,332
8	0,677	0,484
9	0,72	0,729
10	0,732	0,749
11	0,741	0,784
12	0,75	0,786

Tabla 16. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-3 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.

ABSORBANCIAS DE CURVA DE CRECIMIENTO DEL S-4 DE App EN MEDIO BHI Y PECE		
HORA	BHI	PECE
1	0,124	0,035
2	0,127	0,039
3	0,132	0,039
4	0,137	0,065
5	0,143	0,085
6	0,492	0,25
7	0,797	0,643
8	0,814	0,84
9	0,838	0,899
10	0,856	0,905
11	0,869	0,91
12	0,895	0,916

Tabla 17. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-4 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.

ABSORBANCIAS DE CURVA DE CRECIMIENTO DEL S-5a DE App EN MEDIO BHI Y PECE		
HORA	BHI	PECE
1	0,012	0,005
2	0,02	0,006
3	0,022	0,021
4	0,036	0,032
5	0,043	0,088
6	0,09	0,189
7	0,226	0,421
8	0,415	0,692
9	0,535	0,721
10	0,557	0,729
11	0,573	0,729
12	0,578	0,766

Tabla 18. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-5a de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.

ABSORBANCIAS DE CURVA DE CRECIMIENTO DEL S-6 DE App EN MEDIO BHI Y PECE		
HORA	BHI	PECE
1	0,012	0,016
2	0,014	0,017
3	0,016	0,018
4	0,104	0,02
5	0,259	0,033
6	0,618	0,12
7	0,74	0,387
8	0,785	0,815
9	0,802	0,911
10	0,812	0,931
11	0,826	0,944
12	0,84	0,96

Tabla 19. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-6 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.

ABSORBANCIAS DE CURVA DE CRECIMIENTO DEL S-7 DE App EN MEDIO BHI Y PECE		
HORA	BHI	PECE
1	0,003	0,009
2	0,007	0,009
3	0,011	0,016
4	0,012	0,017
5	0,017	0,017
6	0,039	0,043
7	0,079	0,143
8	0,216	0,427
9	0,434	0,622
10	0,56	0,732
11	0,66	0,835
12	0,761	0,844

Tabla 20. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-7 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.

ABSORBANCIAS DE CURVA DE CRECIMIENTO DEL S-8 DE App EN MEDIO BHI Y PECE		
HORA	BHI	PECE
1	0,013	0,006
2	0,029	0,014
3	0,044	0,03
4	0,05	0,039
5	0,162	0,08
6	0,426	0,137
7	0,763	0,15
8	0,798	0,332
9	0,804	0,673
10	0,834	0,732
11	0,843	0,76
12	0,844	0,76

Tabla 21. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-8 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.

ABSORBANCIAS DE CURVA DE CRECIMIENTO DEL S-9 DE App EN MEDIO BHI Y PECE		
HORA	BHI	PECE
1	0,005	0,004
2	0,012	0,004
3	0,016	0,014
4	0,019	0,015
5	0,044	0,027
6	0,211	0,1
7	0,656	0,104
8	0,785	0,625
9	0,804	0,804
10	0,841	0,863
11	0,853	0,874
12	0,866	0,885

Tabla 22. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-9 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.

ABSORBANCIAS DE CURVA DE CRECIMIENTO DEL S-10 DE App EN MEDIO BHI Y PECE		
HORA	BHI	PECE
1	0,006	0,001
2	0,01	0,006
3	0,016	0,016
4	0,016	0,018
5	0,017	0,026
6	0,02	0,045
7	0,233	0,091
8	0,698	0,439
9	0,9	0,856
10	0,961	0,904
11	0,971	0,978
12	0,978	0,98

Tabla 23. Absorbancias a 546 nm de longitud de onda, de la curva de crecimiento del S-10 de App, en un período de 12 horas en medio BHI y PECE.

11.1.2 Cuenta viable

SEROTIPO 1		
Hora	UFC / ml	UFC / ml
1	117,000	99,000
2	143,100	99,750
3	145,800	104,500
4	185,500	115,550
5	422,550	135,800
6	785,000	264,000
7	865,550	414,000
8	867,800	801,400
9	876,450	875,000
10	INC	INC
11	INC	INC
12	INC	INC

Tabla 24. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-1 en caldo BHI y PECE

SEROTIPO 2		
Hora	BHI	PECE
1	150, 500	62, 100
2	174, 000	276, 500
3	253, 000	302, 100
4	312, 000	305, 500
5	513, 500	308, 700
6	620, 500	510, 000
7	778, 000	540, 400
8	820, 000	567, 000
9	898, 400	598, 300
10	910, 000	599000
11	INC.	647, 600
12	INC.	758, 000

Tabla 25. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-2 en caldo BHI y PECE

SEROTIPO 3		
Hora	BHI	PECE
1	123, 000	28, 500
2	127, 400	96, 000
3	146, 500	108, 000
4	149, 000	111, 500
5	152, 500	117, 000
6	398, 700	177, 000
7	520, 000	350, 000
8	578, 600	410,100
9	630, 400	632, 000
10	INC.	INC.
11	INC.	INC.
12	INC.	INC.

Tabla 26. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-3 en caldo BHI y PECE

SEROTIPO 4		
Hora	BHI	PECE
1	420, 500	165, 000
2	424, 000	252, 500
3	428, 000	255, 800
4	432, 000	310, 000
5	438, 500	385, 600
6	690, 300	551, 000
7	742, 000	698, 200
8	786, 500	816, 500
9	810, 000	856, 100
10	INC.	INC.
11	INC.	INC.
12	INC.	INC.

Tabla 27. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-4 en caldo BHI y PECE

SEROTIPO 5a		
Hora	BHI	PECE
1	115, 000	96, 500
2	121, 400	98, 700
3	124, 000	123, 000
4	138, 000	135, 000
5	156, 500	165, 100
6	168, 450	320, 000
7	345, 000	582, 100
8	575, 000	723, 100
9	632, 400	740, 000
10	637, 500	760, 000
11	INC.	INC.
12	INC.	INC.

Tabla 28. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-5a en caldo BHI y PECE

SEROTIPO 6		
Hora	BHI	PECE
1	125, 500	135, 000
2	131, 000	137, 500
3	136, 500	145, 500
4	183, 500	152, 000
5	325, 000	165, 500
6	645, 000	189, 000
7	729, 000	410, 500
8	745, 000	810, 000
9	INC.	INC.
10	INC.	INC.
11	INC.	INC.
12	INC.	INC.

Tabla 29. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-6 en caldo BHI y PECE

SEROTIPO 7		
Hora	BHI	PECE
1	54, 000	58, 000
2	56, 500	59, 000
3	65, 500	78, 000
4	75, 000	89, 000
5	91, 000	90, 500
6	125, 500	136, 000
7	235, 000	415, 000
8	536, 000	654, 000
9	665, 000	710, 000
10	725, 000	825, 000
11	INC.	INC.
12	INC.	INC.

Tabla 30. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-7 en caldo BHI y PECE.

SEROTIPO 8		
Hora	BHI	PECE
1	38, 000	25, 500
2	81, 000	42, 500
3	110, 000	81, 500
4	123, 500	92, 000
5	295, 500	186, 000
6	535, 000	245, 000
7	805, 000	283, 000
8	838, 000	410, 500
9	906, 000	710, 000
10	INC.	INC.
11	INC.	INC.
12	INC.	INC.

Tabla 31. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-8 en caldo BHI y PECE.

SEROTIPO 9		
Hora	BHI	PECE
1	96, 570	84, 000
2	136, 500	84, 200
3	146, 500	142, 530
4	167, 800	144, 000
5	234, 000	197, 200
6	341, 000	267, 500
7	705, 500	268, 450
8	712, 000	702, 000
9	789, 000	789, 400
10	INC.	INC.
11	INC.	INC.
12	INC.	INC.

Tabla 32. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-9 en caldo BHI y PECE.

SEROTIPO 10		
Hora	BHI	PECE
1	45, 000	35, 000
2	114, 500	45, 700
3	118, 100	120, 500
4	119, 500	122, 800
5	123, 000	148, 700
6	146, 500	185, 400
7	426, 700	230, 100
8	780, 800	650, 100
9	932,500	896, 500
10	INC.	INC.
11	INC.	INC.
12	INC.	INC.

Tabla 33. UFC/ml obtenidas en doce horas del S-10 en caldo BHI y PECE.

11.2 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

GLUCOSA AL 20 %

Glucosa (MERCK [®])	20 g
Agua destilada	c.b.p. 100 ml

Se esteriliza con una membrana de 0.8 μm y una de 0.22 μm (millipore). Conservar en refrigeración.

NAD AL 0.5 %

NAD Research Organics [®]	0.5 g
Agua destilada	c.b.p. 100 ml

Se esteriliza con una membrana de 0.8 μm y una de 0.22 μm (millipore). Conservar en congelación.

12.GLOSARIO

- Absceso:** Acumulación localizada de pus en una cavidad orgánica noviformada.
- Absorbancia:** Propiedad física de una sustancia que dentro de ciertos límites puede ser directamente proporcional a su concentración. Es una medición de la cantidad de radiación electromagnética, habitualmente luz que la sustancia absorbe. Esta propiedad se utiliza en la espectrofotometría.
- Agente:** Es el elemento que es capaz de transmitir una enfermedad. En el caso de la EEB, la evidencia sugiere un Prion.
- Amiloide:** Sustancia que aumenta en los tejidos de manera amorfa.
- Antibiótico:** Es cualquier sustancia química producida por un microorganismo, utilizada para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos infecciosos.
- Anticuerpo:** Son un conjunto heterogéneo de proteínas que se producen por la estimulación antigénica del sistema inmunológico y tienen la propiedad de reaccionar específicamente con el antígeno inductor de su producción.
- Ataxia:** Pérdida de la coordinación, asociada a daño neurológico.
- Bacteremia:** Presencia de bacterias patógenas en la sangre.
- Bacterina:** Preparado de bacterias muertas, atenuadas, modificadas, o inactivadas, empleadas para la inmunización y prevención de las enfermedades de los animales.
- Barrera interespecie:** Al parecer se necesita niveles mucho mayores de infectividad para la transmisión de EET de una especie a otra, en comparación entre individuos de una misma especie.
- Bioensayo:** Es la inoculación de tejido en otro animal, con la finalidad de observar si este es infectivo (si lo es, el animal desarrollará la enfermedad.)

- Biotipo:** Son variantes de cepas bacterianas caracterizadas por diferencias bioquímicas.
- Casos esporádicos:** Son los casos de ECJ (o quizás otras EET) que aparentemente no están asociados con un cambio en el gen de la persona que desarrolla la enfermedad, ni tampoco asociado con la inoculación de material infectado.
- Casos iatrogénicos:** Son los casos de ECJ que aparecen como resultado de procedimientos médicos, en los cuales el agente es inoculado en el paciente.
- Célula viable:** célula capaz de dividirse y dar lugar a una descendencia.
- Disnea:** Respiración difícil o laboriosa en la que el sujeto esta conciente de la falta de aire.
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico. Es la sustancia que lleva el genoma en cromosomas de animales, plantas y algunos virus.
- Edema:** Acumulación excesiva de líquido intersticial en cavidades.
- ELISA:** La técnica de enzimoimmunoensayo (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ELISA, para la detección de anticuerpos específicos que se utilizan hoy en día, son técnicas rápidas, sensibles, específicas, de fácil ejecución y permiten analizar un gran número de muestras a la vez.
- Endotoxina:** Son producidas por bacterias Gram negativas. Son lipopolisacáridos, componente estructural de la membrana externa. Son estables al calor y comparándolas con muchas exotoxinas, las endotoxinas tienen una toxicidad relativamente baja.
- Enzima:** Es un catalizador de origen orgánico proteico, producido por una célula viva y capaz de influir en una reacción química sin sufrir un cambio estructural. Regula todos los procesos metabólicos.

- Especificidad:** Es la habilidad de una prueba para detectar sólo a los verdaderos positivos.
- Estabilidad:** Nuevo término que define la capacidad del sistema para eliminar con el paso del tiempo el agente de la EEB tan rápidamente como sea posible. La estabilidad de un sistema dependerá de su capacidad para identificar los bovinos infectados por la EEB y excluirlos del procesamiento, y de su capacidad para evitar el reciclaje del agente de la EEB a través de los piensos. Un sistema "estable" eliminará la EEB con el paso del tiempo, mientras que un sistema "inestable" la amplificará.
- Epidemiología:** Los cambios en el número de casos de una enfermedad, en relación al tiempo y espacio.
- Exotoxina:** Son proteínas (a menudo enzimas) solubles, termolábiles, que el agente patógeno libera a su ambiente durante su crecimiento. A menudo las exotoxinas pueden desplazarse desde el lugar de la infección a otros tejidos corporales o células diana, donde manifiestan sus efectos.
- Exudado:** Materia más o menos fluida que sale de los vasos pequeños y capilares en los procesos inflamatorios, y se deposita en los intersticios de los tejidos o en la cavidad de una serosa.
- Factor V:** Versé NAD.
- Fagocitosis:** Es el proceso por el cual las células especializadas buscan, localizan, identifican e introducen a su citoplasma partículas o gérmenes extraños para matarlos y digerirlos.
- Farmacocinética:** Estudia el movimiento de los fármacos y permite conocer su concentración en la biofase, en función de la dosis y del tiempo transcurrido desde su administración.
- Fimbrias:** Son estructuras que se encuentran en la superficie de muchas bacterias Gram. negativas. Están compuestas por una proteína denominada fimbriolina. Están asociados a la adhesión celular de superficies mucosas.

- Gram negativo:** Las Bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar una membrana celular interna la cual se rodea por una pared celular delgada de peptidoglicano y, hacia el lado externo del cuerpo celular una membrana celular externa que recubre la pared celular en estas bacterias. Entre la membrana citoplasmática interna y la membrana externa está el espacio periplásmico el cual presenta una sustancia llamada periplasma la cual contiene enzimas importantes para la nutrición en estas bacterias. La membrana externa presenta una estructura llamada lipopolisacárido (LPS) y tiene diversas proteínas, siendo una de ellas las proteínas llamadas porinas o canales proteicos. El LPS está formado por tres regiones: el polisacárido O (antígeno O), una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (endotoxina).
- Glicoproteína:** Es una proteína que lleva consigo algunas cadenas de azúcares (glicanos). La proteína PrP lleva dos de estas cadenas, y se cree que estas diferentes cadenas son las que realmente determinan las manifestaciones de las EET.
- Hemoglobina:** Compuesto que se encuentra en un glóbulo rojo y transporta oxígeno.
- Hemocultivo:** Puesta en cultivo de una muestra de sangre extraída por punción venosa con el fin de buscar la presencia de microbios circundantes (en caso de septicemia, por ejemplo).
- Incidencia de EEB:** Es el número de casos confirmados de EEB por millón dentro de la población de ganado por encima de los 24 meses de edad en el país o zona, calculado a lo largo de los últimos 12 meses.
- Inmunoblotting:** Consiste en la separación de proteínas específicas en un filtro de papel, y luego análisis de este para identificar la proteína. Es una forma de purificación segura y eficaz.
- Inmunohistoquímica:** Es el chequeo de secciones de tejido (o muestras de microscopía electrónica) mediante el acoplamiento de anticuerpos a proteínas específicas, y luego la búsqueda de anticuerpos a través de enzimas a las cuales ellos fueron conectados.

- Lisis:** Destrucción de una célula causada por una lisina; descomposición de una sustancia o un sistema.
- Material Específico de Riesgo (MER):** Desechos específicos de bovino. Corresponde a los desechos de vacas que se encontraron que representan un riesgo para la población. Son Timo, Cerebro, espina dorsal, intestino, bazo y tonsilas.
- Medio de cultivo:** Es una sustancia que se prepara en forma sólida (agar), líquida (caldo) o semisólida; se utiliza frecuentemente para seleccionar y cultivar microorganismos específicos para facilitar la identificación de una especie en particular.
- Microglía:** Células inmunes pertenecientes al SNC.
- Modelos murinos:** Modelos de enfermedad, usando ratones como el animal a infectar.
- NAD:** Coenzima termolábil. Es un nucleótido de piridina que contiene una amida del ácido nicotínico derivada de la vitamina niacina.
- Necrosis:** Mortificación de un tejido en general.
- Nódulo:** Órgano situado en el trayecto de los vasos linfáticos, compuesto por una envoltura propia de tejido conjuntivo, sustancia cortical y sustancia medular, cuyas mallas contienen células linfáticas.
- Oligosacárido:** Hidrato de carbono que produce un número pequeño de monosacáridos cuando se produce la hidrólisis.
- Opsonina:** Molécula de origen proteico que reconoce un antígeno y se pega a él, "lo marca", para facilitar la fagocitosis.
- Parénquima:** Elemento esencial específico o funcional de un órgano generalmente glandular, en distinción de la estroma o tejido intersticial.
- Parenteral:** Inoculación en el organismo (no vía oral.)

- Pasaje:** Es la inoculación de una infección en un animal para luego obtener la multiplicación del agente infeccioso proveniente del animal.
- Patogénesis:** Es la producción de daño (patología) en un tejido.
- PCR:** Reacción en cadena de polimerasa. Un método usado para hacer múltiples copias de ADN.
- Peptidoglicano:** Es el componente rígido de la pared celular de todas las bacterias. Están compuestos por un esqueleto de residuos de carbohidratos formados por unidades alternadas de N-acetil glucosalina y de N-acetilmurámico unidos por enlaces beta-1,4.
- Periférica:** Esto generalmente se refiere a la ingestión o inoculación de material en un animal fuera del SNC.
- Placas:** Elementos proteináceos que pueden aumentar en el tejido cerebral como resultado de una infección, estas sin embargo, además de las EET pueden ser encontradas en otras enfermedades.
- Pleomórfico:** Que adopta muchas formas.
- Pleura:** Membrana serosa que reviste la cavidad torácica y que recubre el pulmón.
- Polimerización:** Es la forma en que los priones se pueden incrementar mediante la unión de un PrP al fina del PrPsc cristaloides.
- Producto biológico:** Son organismos y microorganismos vivos o parte de estos atenuados, modificados, o inactivados, empleados para la prevención, diagnóstico, control y tratamiento de las enfermedades de los animales.
- Proteasa K:** Es la enzima que degrada las proteínas eficientemente.
- Rendering:** Se denomina al proceso de tratamiento de los despojos producto del faenamiento y proceso de las carcasas animales, mediante le cual se obtiene harinas de carne y huesos y cebos o grasa para la industria.

- SAF:** Fibras asociadas a Scrapie. Corresponde a finas estructuras, vistas bajo el microscopio electrónico, las que solamente son encontradas en cerebros afectados con alguna EET.
- Scrapie:** Es la EET en ovejas y cabras.
- Sensibilidad:** La s. de un equipo instrumental, técnica y/o método analítico se define como la capacidad para poder diferenciar dos señales muy parecidas del mismo analito, o lo que es lo mismo entre dos magnitudes (concentración, actividades y/o cantidades) similares del mismo.
- Serotipo:** Son variantes de cepas bacterianas que presentan propiedades antigénicas diferenciadoras.
- Serotipificación:** Alude a los procedimientos serológicos que se emplean para diferenciar cepas (serovariedades o serotipos) de microorganismos que difieren en la composición antigénica de una estructura o producto.
- Toxina:** Es una sustancia específica, a menudo un producto metabólico del organismo, que daña a un huésped, provocándole una intoxicación.
- Transmisión Horizontal:** Es la transmisión de una enfermedad de un animal a otro, exceptuando la proveniente de los padres a sus crías. Generalmente esta es la transmisión entre dos animales vivos, donde uno es expuesto al agente proveniente del otro.
- Transmisión materna:** Es la transmisión de la enfermedad de la madre a sus crías (no necesariamente antes del parto.)
- Transmisión Vertical:** Es la transmisión de una enfermedad de padres a sus crías.
- Trombosis:** Formación de coágulos dentro de los vasos sanguíneos.
- Unidad infecciosa:** Esta es la mínima cantidad necesaria para transmitir la EET de un animal a otro de la misma especie.

- Ureasa:** Enzima que cataliza la hidrólisis de la urea, con formación de carbonato de amonio.
- Vacuna:** Es un producto biológico constituido por microorganismos vivos, atenuados, muertos o productos derivados de ellos; que inoculados en un huésped, estimulan un estado de inmunidad específica que le permite resistir las infecciones que este microorganismo causa en forma natural.
- Virus:** Agente infeccioso con una estructura específica y capaz de causar su propia multiplicación después de infectar una célula específica.
- Western Blot:** Reconocimiento de polipéptidos específicos en una muestra, después que las proteínas se han separado mediante electroforesis, transferidas (blott) a un filtro y reconocidas con un anticuerpo específico.

13. REFERENCIAS

1. Straw, Barbara; (et.al). Diseases of swine. 9a edición. Blackwell Publishing. Australia. 2006. pp. 563 – 576.
2. Matthew, P. R.; I. H. Pattison. 1961. The identification of a *Haemophilus-like* organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. J. Comp. Pathol. 71:44-52.
3. Shope Re. 1964. Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. J Exp Med; 119: 357-368.
4. Lo, Terry. 1997. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype by multiplex polymerase chain reaction.
<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-71497-17302/unrestricted/At.pdf>.
5. Kilian, M., J; (et.al). 1978. Biochemical characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Matthews and Pattison1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain. Int. J. Syst. Bacteriol. 28:20-26.
6. Pohl, S., H; (et.al). 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella haemolytica-like* organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) On the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int. J. Syst. Bacteriol. 33:510-514.
7. Haesebrouck, F; (et. al.). 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. Veterinary Microbiology. 58: 239 – 249.
8. Ling, Mei; (et. al). 2006. Study on the Immunogenicity of N – terminal polypeptide of RTX Toxin I of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Chinese Journal Biotechnology. 22 (1): 39 – 45.
9. Dubreuil, J. Daniel; (et. al.). 2000. *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. Animal Health Research Reviews 1(2): 73–93
10. Negrete-abascal, Jorge; (et.al). 2003. Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Journal of Bacteriology, 185 (2): 664–668.
11. Didier PJ; (et.al.). 1984. Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*: microbiologic and pathologic findings. J Am Vet Med Assoc. 184(6):716-719.
12. *Actinobacillus pleuropneumoniae*
[http://sanidadanimal.info_cursos_curso_6_nombre.htm\Actinobacilluspleuropneumoniae \(APP\).htm](http://sanidadanimal.info_cursos_curso_6_nombre.htm\Actinobacilluspleuropneumoniae (APP).htm).
13. Moller, Kristian; (et.al.). 1990. V Factor-Dependent Members of the Family Pasteurellaceae in the Porcine Upper Respiratory Tract. Journal of Clinical Microbiology. 28 (12): 2711-2716.
14. Manual de Medios de Cultivo. BIOXON.
15. Lo, Terry; (et.al.). 1998. Detection and Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology. 36 (6): 1704 – 1710.

16. Bosse, Janine T; (et.al.). 1990. Capsular Polysaccharide Antigens for Detection of Serotype-specific Antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res*; 54: 320-325.
17. FREY, Joachim. 1989. Cloning and Expression of a Cohemolysin, the CAMP Factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*. 57(7): 2050-2056.
18. Bossé, Janine; (et.al). 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection* 4: 225 -235.
19. Manual de laboratorio de *Haemophilus*. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
20. Jobert, Jean-Luc; (et.al.).2000. Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 64:21-26
21. Musser, James M; (et.al.). 1987. Clonal Diversity in *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*. 55(5): 1207-1215.
22. Perry, M. B., E. Altman, J.-R. Brisson, L. M. Beynon, and J. C. Richards. 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Serodiag. Immun. in Infect. Dis.* 4:299-308.
23. Inzana, Thomas J; (et.al.). 1988. Virulence Properties and Protective Efficacy of the Capsular Polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* Serotype 5. *Infection and Immunity*. 56(8): 1880-1889.
24. Rioux, Stéphane; (et.al.). 1997. Isolation y characterization of LPS mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Current Microbiology*. 35: 139 – 144.
25. Huang, Hongsheng; (et.al.). 1998. Pathogenesis of Porcine *Actinobacillus Pleuropneumoniae*: Part I. Effects of Surface Components of *Actinobacillus pleuropneumoniae* In Vitro and In Vivo. *Can J Vet Res*; 62: 93-101.
26. Jacobsen, Ilse. 2005. Deletion of the Ferric Uptake Regulator Fur Impairs the In Vitro Growth and Virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*. 73(6): 3740–3744.
27. Huang, Hongliang; (et.al.). 2006. Generation of monoclonal antibodies and epitope mapping of ApxIVA of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Molecular Immunology* 43: 2130 - 2134.
28. Jarma, Erika; (et.al.). 2004. Growth phase mediated regulation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxI y ApxII toxins. *Microbial pathogenesis* 36: 197 – 203.
29. Bandara, Aloka; (et.al). Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Capsular Polysaccharide with Virulence in Pigs. *Infection and Immunity*, Vol. 71, No. 6, p. 3320–3328.
30. Bossé, Janine; (et.al.). 2003. Genetic and Biochemical Analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Urease. *Infection and Immunity*. 65(11): 4389–4394.

31. Fenwick, B., and S. Henry. 1994. Porcine pleuropneumonia. J. Am. Vet. Med. Assoc. 204:1334–1340.
32. Jacobsen, Ilse; (et.al.). 2005. Enzymes Involved in Anaerobic Respiration Appear to Play a Role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Virulence. Infection and Immunity. 73(1): 226-234.
33. Archibald; (et.al.). 2003. Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. The Canadian Journal of Veterinary Research. 67:271–277.
34. Nielsen, R; (et.al.). 1991. Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 2. Journal of Clinical Microbiology. 29 (4): 794-797.
35. Hennessy, Kristina J; (et.al.). 1993. Serotype Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology. 31(5): 1155-1159.
36. Prideaux, C. T; (et.al.). 1999. Vaccination and Protection of Pigs against Pleuropneumonia with a Vaccine Strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Produced by Site-Specific Mutagenesis of the ApxII Operon. Infection and Immunity. 67 (4): 1962–1966.
37. Rosendal, S; (et.al.). 1985. Comparative Virulence of Porcine Haemophilus Bacteria. Can J Comp Med; 49: 68-74.
38. Macinnes, J. I., and S. Rosendal. 1988. Prevention and control of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine: A review. Can. Vet. J. 29:572-573.
39. Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In, A.D. Leman, B. E. Straw, W.L. Mengeling, S. D’Allaire, and D. J. Taylor (ed), Diseases of swine, Iowa State University Press, Ames. 401 - 408.
40. <http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-71497-17302/unrestricted/At.pdf>
41. Aplicación de la serología para el diagnóstico y control de las enfermedades del "Complejo Respiratorio Porcino" Dr. Abel Ciprián Carrasco - Dra. Susana Mendoza Elvira http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=186.
42. <http://www.eeb.es/>
43. Noti Wiener. "El prion, un nuevo agente infeccioso". No.100: entre la Historia y el Futuro. www.wiener-lab.com.ar/notiw100.htm.
44. <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/Feedsafety/feedsafety.htm>
45. http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm
46. Brown P. 1997. The risk of bovine spongiform encephalopathy ("mad cow disease") to human health. JAMA. 278: 1008-11.
47. Brown P; (et.al). 1999. Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit disease in humans. Transfusion. 39: 1169-78.

48. O.I.E. (Oficina Internacional de Epizootias). Junio 1992. Encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales. Revista científica y técnica de la OIE. 2 (2).
49. WHO infection control guidelines for transmissible spongiform encephalopathies: report of a WHO Consultation. WHO/CDS/CSR/APH/2000.3. Geneva: March 23-26, 1999.
50. <http://www.rlc.fao.org/prion/segalim/animal/eeb/enfermedad/saludhum.htm>
51. <http://www.rlc.fao.org/prion/segalim/animal/eeb/enfermedad/conta.htm>
52. Comisión Europea. 2002. Final Report of a Mission carried out in Brazil in order to Evaluate Measures concerning Bovine Spongiform Encephalopathy. DG (SANCO)/8563/2002 European Commission, Health & Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.
53. Nota explicativa de como minimizar los riesgos de transmisión de los agentes de las EET animales a través de los medicamentos humanos y veterinarios. (EMEA/410/01 Rev. 2- Octubre de 2003) adoptado por el Comité de especialidades farmacéuticas (CEF) y el Comité de medicamentos veterinarios (CMV).
54. Comisión Europea. 1996. BSE fall-out could breach EU budget limit. Agra Europe (British edition). 1692: P/3-P/5.
55. Rushton, J. 2002. The economic impact of livestock diseases. CABI Animal Health and Production Compendium. CAB International, Wallingford, UK.
56. Rushton, J; (et.al). 1999. *Methods of Economic Impact Assessment*. In "The economics of animal disease control" OIE Revue Scientifique et Technique. 18 (2): 315-338. State Veterinary Administration of the Czech Republic.
57. <http://www.svscr.cz/cz/bse/bse2.htm> acceso 15 de enero 2003.
58. DTZ Piedad Consulting. 1998. Economic impact of BSE on the UK economy. UK, DTZ Piedad Consulting, UK, 59 pp.
59. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Revista Panamericana de Salud Pública. Enero 1997. "Los priones, partículas proteínicas con infectividad". Vol.1, No.1 (49).
60. Stanley B. Prusiner. Prions. Proceedings of the National Academy of Science of the USA. 95(23): 13363-13384.
61. Mandell, Douglas and Bennetts. 1995. Principles and Practice of Infectious Diseases and their Etiologic Agents. Section B. Prions. Kenneth L. Tyler. Fourth Edition, Churchill Livingstone Inc.
62. Pan, K.M; (et.al). 1993. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the Scrapie prion proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 10962–10966.
63. Horwich, Arthur L. y. Weissman, Jonathan S. May, 1997. Deadly Conformations: Protein Misfolding in Prion Disease. Cell. 89: 499-510.
64. Villegas de Olazábal, Hugo. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) <http://www.medicos.sa.cr/interes/encefal/htm>.

65. Brooks S, Geo. F (et.al.); Microbiología Médica. Editorial El Manual Moderno. México. 2005. pp. 580.
66. S.B. Prusiner Shattuck. Lecture—Neurodegenerative diseases and Prions. 2001. N. Engl. J. Med. 344: 1516–1526.
67. Brown, D.R; (et.al). Recombinant prion protein exhibits superoxide dismutase. Journal of Neurochemistry 73, suppl. S19B.
68. S. Mouillet-Richard ; (et.al). 2000. Signal transduction trough prion protein. Science. 289: 1925-1927.
69. Vincent Dodelet, BSc; (et.al). 1996. Emerging problems in prion disease. Canadian Medical Association Journal.155: 549-551.
70. Manual de Medios de Cultivo. BIOXON.
71. Deelat, Adrian. Microbiología. Editorial Panamericana.1990. México. p: 361 -362.
72. BD – Diagnostics systems: Mycoplasma agar (PPLO agar).
<http://www.bd.com/ds/productCenter/241210.asp>.
73. P.R.A.S. BRAIN HEART INFUSION BROTH. Remel Apogent. USA. 2003.
<http://www.remel.com/IFUs/IFU5024.pdf>.
74. Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. México. 2002. pp. 140.
75. Prescott, Lansing M; (et.al.). Microbiología. Editorial Mc. Graw-Hill Interamericana. España. 2000. p. 115-118.
76. Pelczar, Michael; (et.al). Microbiología. 4ª edición. Mc. Graw-Hill. México.1999. p 106-109.
77. Byrd, Wyatt; (et.al.). 1989. Structures and Sugar Compositions of Lipopolysaccharides Isolated from Seven Actinobacillus pleuropneumoniae Serotypes. Infection and Immunity. 57(12): 3901-3906.
78. Wells, G.A.H. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. Vet. Rec. 121: 419-420.
79. Documento de posición sobre la evaluación del riesgo de transmisión de los agentes de la encefalopatía espongiforme animal a partir de inóculos maestros utilizados en la fabricación de vacunas veterinarias. (EMEA/CVMP/019/01. febrero de 2001). Adoptado por el Comité de medicamentos veterinarios (CVMP). Julio de 2001. (2001/C 286/06) Diario Oficial de las Comunidades Europeas.
80. Mac Faddin, Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª. Edición Editorial Médica Panamericana. Argentina. 33 -37, 354 -361