

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

***AISLAMIENTO DE Actinobacillus pleuropneumoniae A PARTIR DE
TONSILAS DE CERDOS MENORES DE 4 SEMANAS DE EDAD
EN UNA GRANJA PORCINA COMERCIAL***

***TRABAJO PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA***

***PRESENTA
GARCÍA VARGAS MARIANA***

ASESOR: MVZ VÍCTOR QUINTERO RAMÍREZ.

COASESOR: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

AISLAMIENTO DE Actinobacillus pleuropneumoniae A PARTIR DE TONSILAS DE CERDOS MENORES DE 4 SEMANAS DE EDAD EN UNA GRANJA PORCINA COMERCIAL

Que presenta la pasante: **MARIANA GARCIA VARGAS**
 Con número de cuenta: **30226232-4** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

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 ESPÍRITU”
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 2 de Abril de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en E. Susana Elvira García Vázquez	
VOCAL	M.V.Z. Mario Alberto Velasco Jiménez	
SECRETARIO	M.V.Z. Víctor Quintero Ramírez	
1er SUPLENTE	Dr. José Francisco Morales Alvarez	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Jesús Arturo Sandoval Romero	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

DEDICATORIAS:

(Mamá) Sra. Adela Vargas Velázquez.

Julián, Julián Alejandro, Giacomo.

Esta tesis se la dedico a mi familia quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

Porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ti, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvo impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final.

Por todos los que estuvieron en alguna etapa de mi vida:

Que nunca me dejaron por creer en mí; va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

ÍNDICE:

	Página
Resumen	6
1. Introducción	7
1.1 Nombre.	7
1.2 Etiología.	7
1.3 Cultivo.	8
1.4 Serotipos.	9
1.5 Resistencia en el ambiente y a los factores físico-químicos.	9
1.6 Factores de virulencia.	10
1.7 Epidemiología.	12
1.8 Inmunidad.	13
1.9 Patogenia.	14
1.9.1 Formas clínicas y lesiones.	15
1.9.2 Cuadro hiperagudo.	15
1.9.3. Cuadro agudo.	16
1.9.4 Cuadro crónico.	17
1.9.5 Patología macroscópica y microscópica.	18
1.10 Diagnóstico de laboratorio.	19
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo principal	22
2.2 Objetivos secundarios	22
3. Material y métodos	23
3.1 Lugar del muestreo	23
3.2. Lugar donde se trabajaron las muestras	23
3.3. Raza de los animales	23
3.4 Muestreo	24
3.5 Cultivos bacterianos de las muestras	24
3.6 Aislamiento e Identificación.	24
4. Resultados	25

5. Discusión	28
6. Conclusiones	32
7. Bibliografía	33

RESUMEN

La pleuroneumonía porcina es una de las enfermedades respiratorias más importantes en la industria porcina, presentando un cuadro agudo en cerdos, que suelen morir debido a una neumonía hemorrágica necrótica; sin embargo, el impacto económico de la enfermedad se centra más en la disminución de la tasa de crecimiento de los cerdos enfermos crónicos.

La pleuroneumonía porcina es un proceso respiratorio de carácter infeccioso, agudo o crónico, caracterizado por bronconeumonía necrótica hemorrágica y pleuritis fibrinosa, producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La pleuroneumonía porcina puede presentarse en animales de todas las edades aunque son más susceptibles entre las seis y las quince semanas. La incidencia se incrementa cuando se asocian factores ambientales de carácter estresante, como sucede en el caso del transporte, hacinamiento, la falta de ventilación en las naves y las condiciones climatológicas adversas. Estos hechos sugieren que habitualmente la infección se mantiene subclínicamente hasta que la aparición de ciertos factores estresantes facilita la multiplicación del microorganismo en el aparato respiratorio y a consecuencia de ello, hace su aparición la enfermedad. Un brote típico de pleuroneumonía porcina origina aproximadamente un 50% de morbilidad y un 10% de mortalidad, siempre que los animales no hayan tenido contacto antes con el agente, lo que produce importantes pérdidas económicas derivadas de las bajas y los tratamientos medicamentosos.

En el presente trabajo se realizó el aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir de macerados de tonsila en cerdos de 1 a 4 semanas procedentes de una granja porcina comercial, determinando la presencia de la bacteria desde la primera semana de vida y en todas las semanas evaluadas, con una incidencia general de 31%, siendo un mayor porcentaje de infectados a la cuarta semana de edad, con 47% de los cerdos muestreados.

1. INTRODUCCIÓN.

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina es una de las enfermedades bacterianas más importantes que afectan al tracto respiratorio de los cerdos ^{1, 2 y 3}. Es producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se caracteriza por signos clínicos que varían de acuerdo a la edad del animal, estado inmune, condiciones ambientales y el grado de exposición al agente infeccioso. Puede afectar a cerdos de cualquier edad, pero enferman con más frecuencia a partir de las 8 semanas de vida coincidiendo con la pérdida de inmunidad materna. El curso clínico de la enfermedad puede adoptar tres formas distintas: hiperaguda, aguda o crónica. La enfermedad está presente en todo el mundo. Su control se puede realizar mediante la utilización de vacunas y antibióticos y se han descrito diferentes métodos para su erradicación. Es una enfermedad de gran importancia económica debido a la mortalidad que ocasiona y al costo del tratamiento. ¹

1.1 Nombre.

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina fue observada por primera vez en 1931 por Shope denominando al agente etiológico como *Haemophilus parahaemolyticus*. Años más tarde él y otros investigadores lo denominaron *Haemophilus pleuropneumoniae* debido a que observaron que *Haemophilus parahaemolyticus* y *Haemophilus pleuropneumoniae* eran idénticos.² Posteriormente el agente causal fue transferido al género *Actinobacillus*, quedando definitivamente clasificado como *Actinobacillus pleuropneumoniae*.²

1.2 Etiología.

Actinobacillus pleuropneumoniae es un pequeño cocobacilo pleomórfico que mide 0.5-1.0 x 1.0-2.0 µm. Es gram negativo, encapsulado e inmóvil. Estructuralmente, en la membrana externa, se incluye el lipopolisacárido (LPS) y diferentes tipos de proteínas de interés. La cápsula se relaciona con la patogenia y es muy útil para su clasificación¹.

1.3 Cultivo.

Actinobacillus pleuropneumoniae se divide en dos biotipos, el I es dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), por lo que se requiere agregar una cepa nodriza y muestra satelitismo alrededor de la cepa nodriza. Se observa una mayor extensión de la zona de hemólisis cercana a la cepa nodriza (fenómeno de CAMP). Las cepas del Biotipo II no requieren de factor NAD para su crecimiento ^{1,3} *Actinobacillus pleuropneumoniae* crece a 37° C, preferentemente en presencia de CO₂ (5%), al menos en cultivos iniciales. En 24 horas o menos produce colonias redondas, pequeñas, de 0.5 – 1 mm de diámetro, lisas y brillantes u opacas y de aspecto céreo, de color gris blanquecino.⁴

Para su identificación se realizan pruebas bioquímicas que nos permiten diferenciar a especies semejantes, como se muestra en la tabla 1.

TABLA 1. DETERMINACIONES PRINCIPALES Y DIFERENCIACIÓN METABÓLICA ENTRE <i>A. pleuropneumoniae</i> Y ESPECIES PRÓXIMAS.							
Carácter/ actividad	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. suis</i>	<i>A. indolicus</i>	<i>A. porcinus</i>	<i>A. minor</i>	<i>H. parasuis</i>	<i>P. multocida</i>
Acido de glucosa	+						
Acido de manitol	+	-			-	-	(+)
Acido de xilosa	+	+				-	V
Acido de ribosa	+					+	
Acido de lactosa	D	+			+	-	(-)
Ureasa	+	+			-	-	-
β- galactosidasa	+						
Fosfatasa alcalina	+						
Nitratos	+	+				+	
SH ₂	+						
Hemólisis	+	+	-	-	-	-	-
CAMP	+	-	-	-	-	-	-
V- dependencia	+	-	+	+	+	+	-
X- dependencia	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	-		+	-	-	+	
Producción de Indol	-		+	-	-	-	

Rapp VJ, Ross RF, Young TF.

1.4 Serotipos.

En base a la dependencia del factor NAD se identifican 2 biotipos (I y II). El biotipo I consta de 13 serotipos (1 a 13) y de los serotipos 1 y 5 se derivan dos subtipos (a y b).⁶ Dentro del biotipo II, también se incluyeron serotipos 1 y 2. Ambos biotipos producen Pleuroneumonía Contagiosa Porcina clínicamente indiferenciable.⁶

Actinobacillus pleuropneumoniae se clasifica en serotipos en base a polisacáridos capsulares (CPS) y a lipopolisacáridos (LPS), sin embargo existen similitudes en los LPS de varios serotipos, lo que causa reacciones cruzadas que originan problemas en la tipificación, especialmente de manera muy evidente con los serotipos 1, 9; 11,3; 6,8 y 4, 7. Un serotipo se identifica por sus antígenos K y O.^{7,8}

Las proteínas de la membrana externa (PME) también son antígenos importantes. Se incluyen lipoproteínas y otras proteínas que se expresan en presencia de maltosa o ausencia de hierro libre (condiciones limitantes). Finalmente algunas sustancias solubles que son secretadas durante el crecimiento microbiano poseen carácter antigénico, entre las que destacan las toxinas RTX.⁹

1.5 Resistencia en el ambiente y a los factores físico-químicos.

Actinobacillus pleuropneumoniae es muy lábil en el medio ambiente y en el laboratorio no sobrevive más de 3 días en caldo a temperatura ambiente (independientemente de que tenga o no suplementación con NAD) o un poco más a 4°C. En suero a temperatura ambiente sobrevive hasta 12 días, multiplicándose en el caso de suplementar el medio con NAD o bajar la temperatura a 4°C, aunque a esta temperatura y suplementado, la supervivencia sólo llega a los 18 días. El uso de temperaturas de 80°C en un medio con leche descremada y glicerina, al igual que la liofilización resultan adecuados para su conservación prolongada.

Sin embargo, es muy diferente lo que puede suceder en condiciones de campo en las que el microorganismo se encuentra protegido por las secreciones nasales y fluidos orgánicos que le permiten una mayor supervivencia.¹⁰

Actinobacillus pleuropneumoniae es destruido por la mayoría de los desinfectantes, especialmente los derivados de cloro, aunque este último es inhibido por la materia orgánica. Tampoco es resistente al calor.¹

1.6 Factores de virulencia.

La patogenicidad de *Actinobacillus pleuropneumoniae* es multifactorial, y está integrada por distintos factores estructurales y de secreción; entre los primeros se incluyen componentes de la membrana externa (PME), los LPS, la cápsula, las fimbrias, mientras que entre los segundos se incluyen las toxinas.¹⁰

Los LPS son los principales constituyentes de la membrana externa y poseen propiedades semejantes a las de otros Gram negativos, asociadas a su carácter de endotoxina. Se ha demostrado que intervienen en la capacidad de adhesión de la bacteria al epitelio y al moco traqueobronquial, aumentan el efecto de las toxinas APX sobre macrófagos para la producción de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 y IL-8) que desempeñan una importante función en la patogenia de la enfermedad respiratoria.^{11,12} En la pleuroneumonía porcina se han descrito niveles altos de IL-6, IL-1 y TNF- α en el suero de los animales enfermos y en células de lavado pulmonar 2-4 horas post-infección. El TNF- α aparece tanto en procesos agudos como en crónicos. También induce necrosis del epitelio alveolar por ligadura a receptores de membrana. Incluso representa una alternativa en la captación del hierro, a partir de la hemoglobina.¹¹

El grado de desarrollo de la cápsula varía según los serotipos encontrándose mientras que en los serotipos 1, 3 y 5 está bien definida, en los 2 y 7 la cápsula es pequeña.⁹

Las fimbrias son las estructuras a través de las cuales la bacteria se adhiere al epitelio de las vías respiratorias y pulmón. Se ha demostrado que la Fimbria Tipo 4 está presente en *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se induce su producción durante la lesión pulmonar, lo que sugiere su posible rol en la adhesión al tejido.¹³

Algunas proteínas de la membrana externa actúan como adhesinas hacia las células epiteliales alveolares y a la colágena pulmonar. También actúan como proteínas transportadoras de nutrientes bacterianos, como la maltosa.⁹

Las exotoxinas son el factor de virulencia más importante de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Todas las cepas virulentas producen de 1 a 2 toxinas RTX, denominadas Apx I, APX II y ApxIII. Las Apx forman poros en las membranas celulares, lo que conduce a la lisis de sus células blanco. Apx I, Apx II y Apx III son citotóxicas para células del epitelio alveolar, células endoteliales, eritrocitos, macrófagos alveolares y neutrófilos. La presencia de una y otra, depende de la cepa y el serotipo, de tal modo que algunos serotipos son capaces de producir diferentes combinaciones de dos de ellas, mientras que otros producen solamente Apx I ó Apx II.^{10, 14}

En la tabla 2 se resume la capacidad tóxica de los distintos serotipos.

Tabla 2. Resumen de la producción de toxinas por los serotipos de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>.			
Serotipos	Apx I	Apx II	Apx III
1, 5 a, 5b, 9 y 11	+	+	
2, 3, 4, 6, 8 y 15		+	+
7, 12 y 13		+	
10 y 14	+		

Gottschalk M.

La cuarta toxina es la Apx IV que producen todas las cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, es esencial para que la virulencia sea completa y solo se produce in vivo.¹⁵

Las toxinas también afectan a los linfocitos T, en particular con una disminución de CD3_CD8, lo que altera la respuesta inmune y favorece la cronicidad del proceso. Como todas las cepas producen por lo menos una Apx, la enfermedad es indiferenciable desde el punto de vista clínico, lo que produce una mayor o menor gravedad en función del serotipo implicado.¹⁶ Asimismo afecta a macrófagos alveolares, causando apoptosis.¹⁷

Actinobacillus pleuropneumoniae produce una potente ureasa cuya participación en la patogenia parece tener lugar a largo plazo mediante la disminución de la respuesta inmune local, lo que permitiría la persistencia de la bacteria.

También genera una Superoxidodismutasa-Cu/Zn que facilita la supervivencia bacteriana local dismutando el superóxido generado por las células inflamatorias. Finalmente también se han descrito proteasas que degradan la hemoglobina y la IgA, in vitro; por ejemplo, una de estas sustancias ha sido caracterizada como una metaloproteasa de Zn aunque su papel en la patogenia de la enfermedad todavía no se conoce.¹⁸

1.7 Epidemiología.

La pleuroneumonía contagiosa porcina es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo, pero sobre todo afecta a los países de producción intensiva. Existe una amplia variación en los serotipos prevalentes en diferentes países y eso tiene una relación importante con la virulencia y la severidad con que se presentan los brotes¹⁹.

En México los serotipos reportados son el 1, 5, 7 y 15, sin embargo se requiere un estudio de tipificación de mayor amplitud para confirmar y determinar los serotipos existentes¹⁵.

La entrada de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a una granja negativa es por el ingreso de cerdos portadores. La principal ruta de diseminación de la enfermedad es el contacto directo de cerdo a cerdo o por aerosoles aunque sólo en distancias cortas.

Es posible la supervivencia de la bacteria en el medio ambiente cuando está protegida por materia orgánica, moco o agua, y puede ser transportado por ropa o material contaminado que ha estado en contacto con cerdos infectados en fase aguda.

No se ha demostrado la transmisión de la infección por vectores (pájaros, roedores) ni fomites. Tampoco se ha podido demostrar por inseminación artificial o por transferencia de embriones¹⁹.

El periodo de incubación es muy variable (12 horas a 3 días) dependiendo de factores como la virulencia de la cepa, la dosis infectante, condiciones ambientales en que viven los cerdos, entre otros. Se han descrito casos experimentales con rangos de incubación desde unas horas post-inoculación hasta varios días.

La presencia en la explotación de otras enfermedades como la enfermedad de Aujeszky, PRRS y *Mycoplasma spp* exacerbaban la presentación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* 20, 21.

Por lo general afecta a cerdos entre las 8-24 semanas de edad ¹⁰.

1.8 Inmunidad.

Uno de los elementos claves que determinan la evolución de la enfermedad en las piaras afectadas, lo constituye la inmunidad contra el agente causal. Una vez que un animal se recupera de la infección, adquiere protección contra el desafío por todos los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La presencia de inmunidad calostrual es un factor importante que interfiere en la inmunidad activa de los lechones. La respuesta inmune primaria sólo se produce en lechones que no poseen anticuerpos calostrales al momento de ser desafiados ²².

La duración de la inmunidad pasiva varía entre 2 a 8 semanas dependiendo del nivel de anticuerpos adquiridos. No existe correlación entre los niveles de inmunoglobulinas dirigidos contra antígenos capsulares serotipo específicos y la protección. Esto contrasta con la inmunidad protectora asociada con el nivel de anticuerpos específicos contra las toxinas Apx ^{23, 24}.

Cada uno de los componentes antigénicos de la bacteria han demostrado ser inmunogénicos, sin embargo, cada uno de ellos por separado induce una protección parcial contra los signos clínicos y las lesiones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* ²³.

La inmunidad protectora contra la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* está directamente relacionada con los niveles de anticuerpos específicos contra las toxinas Apx I, Apx II, Apx III y Apx IV ^{23, 24}. La colonización de las amígdalas y de la mucosa nasal puede ocurrir en presencia de anticuerpos calostrales ^{25, 26}.

El desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra las toxinas Apx requiere que la infección se encuentre a nivel pulmonar ya que la colonización a nivel nasal o de amígdalas no induce un nivel suficiente de anticuerpos neutralizantes, por lo tanto, cerdos portadores del microorganismo a nivel de amígdalas o cavidad nasal sin involucrar los pulmones carecen de inmunoglobulinas específicas contra las toxinas Apx de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, esto explica el por qué dichos animales son susceptibles de sufrir la enfermedad a pesar de albergar el agente a nivel del tracto respiratorio superior ^{23,26}.

En relación a la inmunidad calostroal la tasa de transferencia de la inmunidad materna vía calostro hacia los lechones es muy alta, ya que en condiciones naturales las cerdas adquieren inmunidad después de presentar una infección natural ²⁵. Asimismo, este grupo de animales puede ser la fuente de infección a sus crías y a otros animales susceptibles dentro de la granja ²⁶. Con respecto a la duración de inmunidad materna se ha determinado entre 2 y 4 semanas, medida por prueba de ELISA Apx IV ²⁴. En el caso de hembras vacunadas la duración de la inmunidad en sus hijos puede prolongarse hasta una media de 7 semanas +/- 1 semana de edad ²⁷.

1.9 Patogenia.

La infección se transmite por aerosol o por contacto directo entre animal enfermo y animal sano. En estudios de infección experimental se ha podido demostrar que *Actinobacillus pleuropneumoniae* coloniza las tonsilas y el epitelio alveolar ²⁵.

En el pulmón el microorganismo es fagocitado rápidamente por los macrófagos alveolares, pero debido a la producción de las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII que tienen un marcado efecto tóxico para los macrófagos alveolares, estos son afectados en su capacidad de destrucción intracelular ¹⁷.

Las toxinas también afectan a las células endoteliales de los vasos capilares alveolares y sus efectos son los causantes de las lesiones de trombosis e infarto típicas de esta enfermedad. En infecciones experimentales se han observado daños pulmonares que comienzan a ser evidentes a las tres horas post-infección y continúan de forma progresiva ²⁸.

1.9.1 Formas clínicas y lesiones.

Los signos clínicos de la enfermedad varían con la edad del animal, su estado inmunitario, las condiciones ambientales y el grado de exposición al agente infeccioso. El curso clínico de la enfermedad puede presentar tres formas distintas: hiperaguda, aguda y crónica. Los cuadros hiperagudo y agudo son típicos de explotaciones libres del agente mientras que el cuadro crónico está más relacionado con áreas donde el padecimiento es endémico ¹.

1.9.2 Cuadro hiperagudo.

Este cuadro se caracteriza por la siguiente secuencia de acontecimientos ^{28,29}

- Aparición repentina de algunos animales muy enfermos con fiebre (41.5-42°C), anorexia y apatía (siendo estos animales los últimos en levantarse cuando se entra en el corral).
- Período breve de vómitos, diarrea leve, tos y epistaxis. Rápido aumento del pulso, insuficiencia cardíaca y respiratoria.
- Cianosis en piel de la nariz, orejas, patas y al final de todo el cuerpo.
- Fase terminal:
 - Posición de perro sentado. Disnea grave con respiración oral (abdominal) y disminución brusca de la temperatura rectal.
 - Secreción abundante, espumosa y teñida de sangre a través de los ollares y la boca, antes de la muerte.
 - Muerte dentro de las 24 - 36 horas del desarrollo de los signos clínicos. En animales jóvenes la muerte puede presentarse tan rápidamente que no lleguen a observarse los signos anteriormente mencionados.
 - En reproductoras se han descrito abortos de forma ocasional.

- Las tasas de morbilidad y mortalidad oscilan alrededor del 30 - 35%, dependiendo de la experiencia inmunológica de la explotación.
- Ocasionalmente muerte súbita sin signos clínicos.

1.9.3. Cuadro agudo.

Se presentan los siguientes signos ^{1, 23}:

- En el mismo o en diferentes corrales dentro de la nave, aparecen muchos cerdos afectados con fiebre (40.5-41°C). Los animales enfermos rechazan la comida, no quieren beber y están deprimidos .
- Se observan síntomas respiratorios graves: tos, disnea y ocasionalmente respiración por la boca. Se presenta insuficiencia cardiaca y circulatoria con congestión de extremidades.
- Evidente pérdida de condición corporal después de 24 horas de iniciarse la enfermedad.
- La evolución de la enfermedad difiere de unos animales a otros, dependiendo de la extensión de las lesiones pulmonares y del tiempo de iniciación del tratamiento terapéutico.
- La muerte se debe a una combinación de una falla cardiaca y de toxinas producidas por el organismo.
- Es posible observar cualquier tipo de evolución: desde la muerte de animales en pocos días hasta la evolución a la forma crónica.
- La morbilidad es muy alta (10 - 50%) y la mortalidad oscila entre el 3 - 30% en animales de engorda y superior al 40% en cerdos más jóvenes. Las tasas de morbilidad y mortalidad dependen de la virulencia de la cepa y de las condiciones ambientales en particular

1.9.4 Cuadro crónico.

Los signos más característicos son los siguientes. ^{1, 29}

- Aparece después del cuadro agudo. No existe fiebre y se observa tos variable e intermitente.
- Apetito reducido, intolerancia al ejercicio (estos animales son los últimos en levantarse cuando se entra en el corral). Presentan neumonía caracterizada por respiración abdominal debido a una pleuritis muy dolorosa.
- Los signos clínicos pueden exacerbarse por otras infecciones respiratorias (bacterias, virus, micoplasmas).
- Los cerdos sobrevivientes presentan un marcado retraso de crecimiento
- Los cerdos afectados pueden transportar el microorganismo durante largos períodos de tiempo y por lo tanto representan un riesgo potencial para los cerdos más jóvenes.

1.9.5 Patología macroscópica

Se localizan principalmente en el aparato respiratorio y varían de acuerdo al cuadro de la enfermedad ^{28,29}.

Cuadro hiperagudo: la tráquea y los bronquios están llenos de exudado mucoso, espumoso y teñido con sangre. Las áreas con neumonía fibrinohemorrágica severa presentan exudado fibrinoso y un color rojo oscuro. También podemos observar pleuritis serofibrinosa ^{28,29}.

Cuadro agudo: los pulmones presentan un cuadro de neumonía fibrinohemorrágica severa, que abarca parte de lóbulos caudales y los lóbulos craneales, encontrándose también en los primeros áreas de infarto rojo de tamaño variable. La inflamación de la pleura es muy aparente y la cavidad torácica contiene líquido sanguinolento. A medida que las lesiones avanzan, la pleuritis fibrinosa se vuelve fibrosa y puede adherirse tan fuerte a la pleura parietal que el parénquima pulmonar puede permanecer fijado a ésta cuando se extraen los pulmones en el examen post-mortem ^{28,29}.

Cuadro crónico: las lesiones se retraen y disminuyen de tamaño a medida que la resolución progresa, hasta que permanecen nódulos de diferentes tamaños (abscesos firmes bien delimitados), la mayoría de ellos localizados en el lóbulo caudal. Estos nódulos pueden asociarse con áreas de pleuritis fibrosa adherente. Una elevada incidencia de pleuritis crónica al sacrificio es muy sugerente de la presencia de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina³⁰.

1.9.6 Patología microscópicas.

En las áreas pulmonares afectadas de la forma aguda, se observa una intensa congestión, hemorragia y edema alveolar. En estos tejidos los septos interlobulillares aparecen engrosados por el edema intersticial, con los vasos linfáticos dilatados, y presencia de células inflamatorias y eritrocitos entre las redes de fibrina^{1,27,28}.

Los alvéolos contienen células inflamatorias, células descamadas y abundante fibrina. Las zonas que corresponden a infartos presentan necrosis coagulativa asociada con vasculitis y trombosis³¹. Alrededor de los focos de necrosis destaca una franja celular basófila formada por acúmulos de neutrófilos modificados de aspecto fusiforme, que llenan la luz alveolar^{28,31}.

Las lesiones en vías aéreas se manifiestan en forma de exudado fibrinoso compuesto por células epiteliales, células inflamatorias y fibrina. La pleuritis es serofibrinosa²⁸.

Si el proceso evoluciona hacia la cronicidad tiene lugar la proliferación de tejido de granulación alrededor de las zonas de necrosis, que posteriormente son limitadas por una cápsula de tejido conectivo. Estas lesiones contienen un elevado número de microorganismos, lo que determina un estado de animales portadores crónicos, pudiendo tener lugar una exacerbación de los síntomas y la aparición de complicaciones debidas a la intervención de otros microorganismos oportunistas³⁰.

1.10 Diagnóstico de laboratorio.

Aislamiento bacteriológico.

Para el aislamiento bacteriano se utilizan muestras que incluyen los pulmones y las tonsilas. En el laboratorio se realiza la toma de diversas zonas del pulmón, de preferencia de zonas con lesiones bien delimitadas, incluso encapsuladas, mejor de la periferia que del centro. También pueden tomarse muestras mediante hisopos del parénquima pulmonar al que se accede durante la necropsia después de cauterizar con una espátula al rojo la superficie del órgano. Es conveniente el uso de medios de transporte, como el medio de Stuart, que prolongan la supervivencia del microorganismo al laboratorio. En animales vivos se ha descrito una técnica de toma de muestra por biopsia de tonsila ^{32,33}.

El agar sangre es un medio que se utiliza con una estría nodriza de especies productoras de factor V, además posee la ventaja de manifestar hemólisis ³⁴.

Serología y tipificación.

La serotipificación es el método comúnmente utilizado y se basa en la determinación del tipo de antígenos capsulares presentes en cada aislamiento, que permite su agrupación en serotipos, utilizando para ello antisueros específicos policlonales o monoclonales. Un inconveniente del serotipado tradicional incluye la presencia de reacciones cruzadas ^{35,36}.

Se han descrito un sinnúmero de reacciones cruzadas, que dificultan una buena conclusión del serotipo, aunque son especialmente importantes las debidas al carácter inmunodominante del LPS y que hacen reaccionar a los serotipos 1, 9 y 11, el 4 con el 7 y, finalmente, el 3, 6 y 8; otras reacciones se deben a la contaminación del reactivo diagnóstico con antígenos de origen citoplasmático, debido a una manipulación o procesamiento inadecuados. ¹⁹

Fijación del complemento

Al principio fue utilizada como un método de detección de especie y posteriormente se empleó como una prueba de detección del serotipo. Los antígenos se preparan por sonicación de una suspensión de bacterias, tomando el sobrenadante. Se requiere la presencia de complemento, que es suero fetal bovino y el suero problema.

La fijación del complemento es más específica que la hemaglutinación indirecta, porque es capaz de distinguir entre *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Haemophilus parasuis* pero su validez para el serotipado es cuestionada ya que la frecuencia de falsos negativos es alta¹. La realización de esta prueba es un proceso laborioso y complejo, que requiere un elevado grado de estandarización para su éxito y con inconvenientes técnicos que lo complican.^{19,23}

ELISA

En la actualidad el procedimiento de ELISA más utilizado es el que detecta anticuerpos contra la toxina Apx IV. Esta toxina es producida sola y únicamente por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y por ninguna otra especie bacteriana, y solamente cuando la bacteria está viva en el animal. Además, cerdos vacunados con bacterinas o con la vacuna a base de toxinas, no presentan ninguna reacción serológica, lo que permite de diferenciar animales vacunados de aquellos infectados. El inconveniente de este kit, es que no diferencia entre los serotipos. Muchas granjas están infectadas por varios serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la mayoría de los cuales no son patógenos. Estas granjas darán resultados positivos, y no se podrá diferenciar de otra granja que este infectada con un serotipo gravemente patógeno³⁷.

Aglutinación y coaglutinación

Son métodos simples, rápidos o lentos (aglutinación), para la identificación y serotipado de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. 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 portaobjetos. Con el antisuero se practican diluciones seriadas, que se mezclan con el antígeno a partes iguales y el resultado de la aglutinación se determina por inspección visual³⁸.

Detección directa

Los métodos convencionales de aislamiento e identificación necesitan, al menos, de 3-4 días, por lo que los procedimientos que identifican el agente directamente en muestras clínicas son de inestimable ayuda, al acortar el tiempo necesario para aplicar las medidas de control más adecuadas. Se incluyen la coagulación, técnicas inmunohistoquímica o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ^{10,24, 39, 40}.

Inmunohistoquímica

Se ha descrito la técnica de inmunohistoquímica basada en la utilización de antisueros específicos de serotipo, que se revelan con sueros secundarios marcados con peroxidasa, pudiendo amplificarse la reacción mediante un tercer suero antiperoxidasa marcado con peroxidasa. También pueden emplearse sueros primarios marcados con biotina, en cuyo caso se revela la reacción con los complejos avidina-peroxidasa o estreptavidina-biotina-peroxidasa. Son técnicas rápidas, fáciles de ejecutar y que permiten el empleo de muestras fijadas antiguas ³⁹.

PCR

Es un método eficaz para la detección y el tipificado de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y se plantea como una alternativa a los métodos inmunológicos. Se utilizó por primera vez en 1991 con *primers* inespecíficos ⁴⁰.

Finalmente, en base a la secuencia del gen *aroA*, también se ha desarrollado un sistema PCR-RFLP que permite la separación de los doce serotipos del biotipo I en tres grupos, aunque se presentan reacciones cruzadas con *Actinobacillus. equuli* ⁴¹.

Detección indirecta

Se han utilizado diversos procedimientos para la identificación de anticuerpos en animales infectados, como la aglutinación en tubo con 2-ME, la hemoaglutinación indirecta, el immunoblotting, el radioinmunoensayo, la fijación del complemento, el ELISA y la neutralización de la hemolisina Apx 1 ⁴¹.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Evaluar la colonización por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en tonsilas de lechones menores de 4 semanas de edad en condiciones de granja comercial.

2.2 Objetivos secundarios

Estandarizar la técnica de aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir de tonsilas obtenidas de lechones muertos.

Establecer la edad mínima de colonización por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en tonsilas.

Evaluar la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en las 4 primeras semanas de vida.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Lugar de Muestreo

El estudio se realizó en la granja porcina “Campoamor” ubicada en el municipio de Texcoco, Santiago Cuautlalpan (Calle General Mariano Ruiz #121), Edo de México altitud de 2.260 metros sobre el nivel del mar, latitud 19.4167, temperatura 29 C, humedad 12%, precipitación pluvial media anual de 686.0 mm.

Cuenta con 2000 vientres en ciclo completo, y un inventario de 18,500 cerdos en línea de producción.

3.2. Lugar donde se trabajaron las muestras

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de virología del edificio de posgrado en campo 1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

3.3. Raza de los animales

La línea que se maneja en la explotación es Landrace, York, Duroc-Pietrain y Hamp.

3.4 Muestreo

Se tomaron aleatoriamente cerdos de las cuatro primeras semanas de vida, 15 cerdos por semana para tener un muestreo de 60 cerdos los cuales seleccionados no excediendo las 2 primeras horas posteriores a la muerte, cabe mencionar que un porcentaje de estos fue sacrificado. Para la toma de muestra se realizó la disección aséptica de las tonsilas de aproximadamente 1cc³⁵ dos profundas incisiones mediales a las ramas de la mandíbula, luego se introdujo por una de estas incisiones el dedo índice en la cavidad oral para sacar la punta de la lengua por la otra. Una vez hecho esto, se cortaron las adherencias de la lengua a la sínfisis mandibular, se extrae la lengua de forma ventral hasta su completa exposición, momento en el que queda al descubierto las tonsilas palatinas, con una pinza de disección con dientes y una tijera quirúrgica punta roma se realizó la extracción de las tonsilas, se colocaron en una bolsa de nylon auto sella. Las muestras se transportan conservándolas en congelación 4 C.

3.5 Cultivos bacterianos de las muestras

Las tonsilas fueron trabajadas en maceradores tipo Tem Broek con 5 ml de PBS (“Buffer” de fosfatos) estéril, después de que el tejido se disgregó completamente, se pasa a tubos y se congelan a -20 C.

3.6 Aislamiento e Identificación.

Cada muestra fue sembrada en diferentes medios de cultivo Agar Sangre, Agar Infusión Cerebro Corazón (agar BHI), Agar PPLO los cuales fueron preparados según las especificaciones del proveedor, a cada caja con el cultivo se le colocó una estría de cepa nodriza (*Staphylococcus aureus*).

A todas las bacterias que se aislaron se les realizaron pruebas bioquímicas primarias, como primer paso de identificación, posteriormente se realizaron algunas pruebas bioquímicas secundarias como son dependencia del factor V; del factor X, y azúcares⁴⁵

4. RESULTADOS

Las bacterias aisladas y purificadas en los diferentes medios de cultivo, se colocaron en la estufa bacteriológica a 37 C por 24 hr, posteriormente se les realizó la tinción de Gram dando como resultado Gram negativas observándose bacilos cortos o cocobacilos. En el agar sangre a tras luz se observó el satelitismo, era evidente el crecimiento de las colonias alrededor de la cepa nodriza y se observó también la hemólisis (Imagen No.1), en el agar BHI como lo muestra la (Imagen 2) se observa el satelitismo.



Imagen No 1

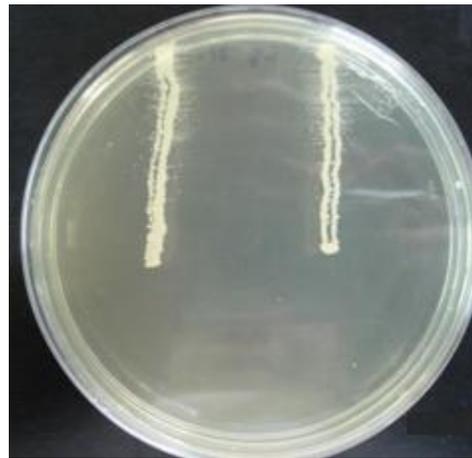


Imagen No. 2

En la Tabla 3 se puede observar que las bacterias aisladas que mostraron tener la forma de cocobacilo y fueron Gram negativas, fueron positivas a las siguientes pruebas bioquímicas, lo cual permitió identificar *A. pleuropneumoniae*

Tabla 3.- Pruebas para identificar *A. pleuropneumoniae*

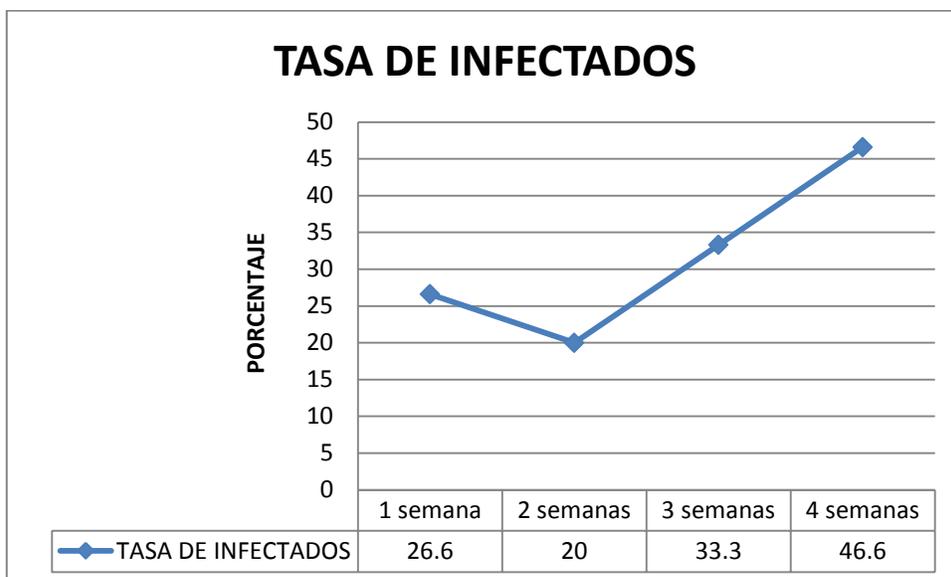
Prueba	<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>A. suis</i>	<i>H. parasuis</i>	<i>P. multocida</i>
Acido de glucosa	+			
Ureasa	+	+	-	-
Hemólisis	+	+	-	-
CAMP	+	-	-	-
V-dependencia	+	-	+	-
X-dependencia	-	-	-	-
Catalasa	-		+	
Producción de Indol	-		-	+

De las 15 muestras por grupo se obtuvo el aislamiento de *A. pleuropneumoniae* como se muestra en la tabla 4 y en la gráfica 1 se observan las tasas de colonización por edad semanal y el nivel de inmunidad materna.

Tabla 4. Número de aislamientos positivos y porcentajes de *A. pleuropneumoniae* en las cuatro semanas de edad.

SEMANA DE EDAD	POSITIVOS	PREVALENCIA
SEMANA 1	4/15	26 %
SEMANA 2	3/15	20 %
SEMANA 3	5/15	33 %
SEMANA 4	7/15	46 %

Gráfica 1. Presencia de *A. pleuropneumoniae* en las primeras 4 semanas de vida.



Se realizó la prueba de Análisis de Varianza para determinar si había diferencia estadística entre los grupos de edades de lechones. El resultado del análisis es que la colonización es igual en todos los grupos y no hay diferencia estadísticamente significativa, con un $p < 0.05$

5. DISCUSIÓN

La infección se produce por aerosol o por contacto directo entre animal enfermo y animal sano. En estudios de infección experimental se ha podido demostrar que *A. pleuropneumoniae* coloniza las tonsilas y el epitelio alveolar. En el pulmón el microorganismo es fagocitado rápidamente por los macrófagos alveolares, pero debido a la producción de las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII que tienen un marcado efecto tóxico para los macrófagos alveolares, la fagocitosis no actúa adecuadamente. Las toxinas también afectan a las células endoteliales de los vasos capilares alveolares y sus efectos son los causantes de las lesiones típicas de esta enfermedad. En infecciones experimentales se han observado lesiones pulmonares que comienzan a ser evidentes a las tres horas post-infección y continúan, después, de forma progresiva Gottschalk, M. (2012)¹⁹

En este trabajo se determinó que *A. pleuropneumoniae* es capaz de colonizar a los cerdos desde la primera semana de edad, lo que concuerda con Marsteller y Fenwick ⁴² que indican esta posibilidad cuando los cerdos de la maternidad están infectados

Se ha establecido que *A. pleuropneumoniae* es un colonizador tardío. Se considera que el destete a una edad de 10 días reduce el riesgo de colonización hasta en un 90% Mendoza y Ciprian, 2002 ³⁶, y que el destete a 16 días reduce en un 50% el riesgo de encontrar un cerdo colonizado. Estas tasas de colonización pueden variar de acuerdo a la inmunidad materna, sin embargo en el trabajo de tesis se tuvieron 7 muestras positivas de 30 muestras totales de las primeras dos semanas de vida, lo que representa un 23.3 % de prevalencia.

Para la semana 3 de edad se encontraron 5 muestras positivas, lo que aunado a las 7 muestras de las primeras dos semanas nos da un total de 12 positivos de 45 animales muestreados, con un 26.6 % de prevalencia. Esta es la edad en que habitualmente se desteta a los cerdos en granjas comerciales, por lo que la posibilidad de enviar cerdos positivos es alta, sin embargo difiere de Mendoza y Ciprián A (2002)³⁶ quienes marcan que de los 18 a 20 días de edad la probabilidad de positividad es del 50 %.

En el periodo de lactancia la transmisión de la infección debe atribuirse a la cerda madre, ya que es la fuente más cercana de contaminación por contacto directo de *A. pleuropneumoniae*, sobre todo si las divisiones entre una jaula de maternidad y otra son de un material sólido. En el caso de panel de alambre metálico existe la posibilidad de transmisión entre lechones de una camada a otra. Debe considerarse una investigación sobre esta posibilidad de difusión de la infección en base a la variable de material de construcción de la jaula.

En la cuarta semana de edad se establece una prevalencia de 46 % de cerdos colonizados. En este incremento en la tasa de infección debe considerarse la transmisión horizontal entre cerdos con diferente nivel de colonización.

Un factor que en este caso al parecer no tiene un papel significativo es la inmunidad materna, ya que aun en este grupo se detecta una inmunidad del 100 % de cerdos muestreados y sin embargo la tasa de colonización se incrementó considerablemente con relación a los grupos de menor edad. Esto sugiere que la mezcla de cerdos y la posibilidad de transmisión horizontal es un factor de gran importancia en la infección, probablemente más significativo que la protección que pueda brindar la inmunidad materna. En otro trabajo, Chiers y cols. (2002)²⁶ estudiaron los perfiles serológicos y de infección en distintas granjas, con distinto tipo de instalaciones. Demostraron que la infección por *A. pleuropneumoniae* serotipo 2, en un estudio longitudinal, se establecía en animales de 12 semanas, donde también encontraron lesiones compatibles con infección por *A. pleuropneumoniae*. A las 16 semanas encontraron en los mismos animales infección por serotipo 10, especulando que la misma era producto de la mezcla de los animales en el engorde. En otras granjas determinaron que títulos de anticuerpos calostrales decrecían a las 8 semanas de vida, estableciéndose seroconversión a partir de las 16 semanas, lo que denotaba que la infección se producía a partir de la semana 12.

Estos autores encontraron colonización de tonsilas y cavidad nasal por *A. pleuropneumoniae* a partir de las 4 semanas de vida, confirmando que puede establecerse la infección en presencia de anticuerpos calostrales, pero no encontraron colonización pulmonar hasta las 12 semanas, especulando que tales anticuerpos podrían prevenir la infección pulmonar.

Sin embargo animales con tonsilas y cavidad nasal positivas eran negativos serológicamente, sugiriendo que tal infección no provoca seroconversión. No obstante ello debe considerarse que el método serológico utilizado tal vez no era lo suficientemente sensible para detectarlos

Sjolund M y cols. (2010)²³ , evaluaron la correlación de cantidad de anticuerpos en la madre y los lechones, encontrando una correlación positiva entre alta inmunidad en la madre igual a alta inmunidad del lechón. A pesar de la elevada inmunidad se detectó cerdos a las 9 semanas de edad, lo que se puede interpretar como una colonización a pesar de la alta inmunidad, lo que concuerda con nuestros hallazgos.

Utrera V. y cols.(2002)²⁷ reportan una mejora en la protección de los lechones cuando la madre tiene títulos elevados de anticuerpos inhibidores de hemolisinas, sin embargo su medición es en base a efecto clínico, no en colonización, como fue el caso.

Estos resultados ponen en duda la utilidad del destete temprano como una posibilidad de eliminación de *A. pleuropneumoniae*. De acuerdo a Muirhead y Alexander (2007)⁴³ no se desarrollaban colonizaciones tan prematuras, por lo que se establecía la posibilidad de destetar de menos de 21 días de lactancia sin riesgo de transmisión de la infección.

Históricamente se ha considerado que *A. pleuropneumoniae* coloniza hasta que la inmunidad materna se ha terminado, sin embargo en esta tesis se tuvieron 19 muestras positivas, lo que representa un 31.6 % de frecuencia.

Aun en presencia de inmunidad materna se observa colonización, lo que determina el riesgo de enviar cerdos infectados a sitios 2 y 3, con la consecuente posibilidad de desarrollar la enfermedad.

Estos resultados ponen en duda la utilidad del destete temprano como una posibilidad de eliminación de *A. pleuropneumoniae*.

De acuerdo a Muirhead y Alexander⁴³ no se desarrollaban colonizaciones tan prematuras, por lo que se establecía la posibilidad de destetar de menos de 21 días de lactancia sin riesgo de transmisión de la infección.

El procedimiento de macerado del tejido tonsilar resulto ser un procedimiento adecuado para el aislamiento de *A. pleuropneumoniae* y sería útil hacer una comparación con otras técnicas de diagnóstico como raspado epitelial, inmunohistoquímica y PCR para detectar antígenos de *A. pleuropneumoniae* y correlacionar con la sensibilidad de la prueba.

6. CONCLUSIONES

La técnica de aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en macerados de tonsilas obtenidas de lechones muertos, resultó una buena opción.

Se observó que hay colonización de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en tonsilas de lechones menores de 4 semanas de edad en condiciones de granja comercial, con un 31.6 % en un tamaño de muestra de 60 lechones.

En la primera semana de edad en este estudio se establece como la edad mínima de colonización por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en tonsilas.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Gottschalk M., Taylor D.J., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, in: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. (Eds.), Diseases of swine, Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, (2006), pp. 563–576.
- 2.-Pohl S, Bertschinger HU, Frederiksen W, Manheim W. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *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. *Inst J Syst Bacteriol* (1983);33:510-514.
- 3.- Glibride KA, Rosendal S. Evaluation of a selective medium for isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can J Comp Med* (1983);47:445-450.
- 4.- Gillespie, SH and Hawkey, PM. Principles and practice of clinical bacteriology. 2nd ed. John Wiley and sons Ed. (2006).
- 5.--Rapp VJ, Ross RF, Young TF. Characterization of *Haemophilus spp.* Isolated from healthy swine and evaluation of cross-reactivity of complement-fixing antibiotics to *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus* taxon "Minor group". *J Clin Microbiol* (1985);22:945-950.
- 6.- Nielsen R. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs (thesis). Copenhagen, (1982).
- 7.-Belanger M, Dubreuil D, Jacques M. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolisaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular layer. *Inf and Imm* (1994);62:868-87
- 8.-Fenwick BW. Virulence attributes of the lipopolisaccharides of the HAP group of organisms. *Can J Vet Res* (1990);54:S28-S32.
- 9.- Shakarji L., Mikael L.G., Srikumar R., Kobisch M., Coulton J.W., Jacques M., FhuA and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their role as virulence determinants, *Can. J. Microbiol.* (2006) 52:391–396.

- 10.- Chiers, K, Waele, TD, Pasmans, F, Ducatelle, R, Haesebrouck, F: Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet. Res.* (2010) 41:65
- 11.- Auger E., Deslandes V., Ramjeet M., Contreras I., Nash J.H.E., Harel J., et al., Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells, *Infect. Immun.* (2009) 77:1426–1441.
- 12.- Bandara A.B., Lawrence M.L., Veit H.P., Inzana T.J., Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs, *Infect. Immun.* (2003) 71:3320–3328.
- 13.- Van Overbeke I., Chiers K., Charlier G., Vandenberghe I., Van Beeumen J., Ducatelle R., Haesebrouck F., Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells, *Vet. Microbiol.* (2002) 88:59–74.
- 14.- Bosse´ J.T., Janson H., Sheehan B.J., Beddek A.J., Rycroft A.N., Kroll J.S., Langford P.R. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection, *Microbes Infect.* (2002) 4:225–235.
- 15.- Gottschalk M. Tendencias actuales en el control de *Actinobacillus*, *Hemophilus* y *Streptococcus*. XXXIV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; (2004), julio 28-agosto 1º; Mazatlán, (Sinaloa) México: 82-91
- 16.- Faldyna, M. Nechvatalova, K. Sinkora, J. Knotigova, P. Leva, L. Krejki, J. Toman, M. Experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in piglets with different types and levels of specific protection: Immunophenotypic analysis of lymphocyte subsets in the circulation and respiratory mucosal lymphoid tissue. (2005) *Vet Immunol Immunopath* (2005)107:143-152
- 17.- Chien M.S., Chan Y.Y., Chen Z.W., Wu C.M., Liao J.W., Chen T.H., et al., *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages, *Vet. Microbiol.* (2009) 135:327–333.
- 18.- Baltes N., Hennig-Pauka I., Jacobsen I., Gruber A.D., Gerlach G.F., Identification of dimethyl sulfoxide reductase in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its role in infection, *Infect. Immun.* (2003) 71:6784–6792.

- 19.- Gottschalk, M. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: an old but still relevant swine pathogen in the XXI Century. 22nd IPVS Congress (2012), 10-13-june (2012), Jeju, Korea. p.26-30
- 20.- Marois C., Gottschalk M., Morvan H., Fablet C., Madec F., Kobisch M., Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*, Vet. Microbiol. (2009) 135:283–291
- 21.- Pol J.M.A., van Leengoed L.A.M.G., Stockhofe N., Kok G., Wensvoort G., Dual infections of PRRSV/ influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract, Vet. Microbiol. (1997) 55:259 264.
- 22.- Vigre H., Angen O., Barfod K., Lavritsen D.T., Sorensen V., Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies, Vet. Microbiol. (2002) 89:151–159.
- 23.- Sjölund, M. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. A major respiratory pathogen in pigs, Ph D. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden, (2010).
- 24.- Garcia, O. Calle, E. Falcon, P. Torres, M. Pinto, C. Persistencia de inmunidad pasiva contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos en la etapa de recría. Rev. Inv. Vet. Perú, (2010) (1) 119-123.
- 25.- Chiers K., Haesebrouck F., van Overbeke I., Charlier G., Ducatelle R., Early in vivo interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs, Vet. Microbiol. (1999) 68:301–306.
- 26.- Chiers K, Donné E, Van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F.: *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. Vet Microbiol. (2002) Apr 2;85(4):343-52.
- 27.- Utrera V, E. Sogbe E, Villalobos J, Rausseo L, Cano JP y Fuentes D: Efecto de la estabilización de la inmunidad de las cerdas reproductoras sobre la eficacia de programas de vacunación contra la pleuroneumonía porcina. Revista Científica, FCV-LUZ (2002). XII, (2), 137-142
- 28.- Bertram TA. Pathobiology of acute pulmonary lesions in swine infected with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. Can Vet J (1988);29:574-577.

- 29.- Liggett AD, Harrison LR. Sequential study of lesion development in experimental *Haemophilus pleuropneumoniae*. Res Vet Sci (1987);42:204-221.
- 30.- Fraile, L. Alegre, A. Lopez-Jimenez, R, Nofrarias, M. Segales, J. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. Vet J. (2010) 184:326-333.
- 31.- Bertram TA. Intravascular macrophages in lungs of pigs infected with *Haemophilus pleuropneumoniae*. Vet Pathol (1986);23:681-691.
- 32.- Sidibe´ M., Messier S., Lariviere S., Gottschalk M., Mittal K.R., Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests, Can. J. Vet. Res. (1993) 57:204–208
- 33.- American Association of Swine Veterinarians. Got tonsils. Technical Manual (2003).
- 34.- Jacobsen MJ, Nielsen JP. Development and evaluation of a selective and indicator medium for isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from tonsils. Vet Micro (1995);47:191-197
- 35.- Alcántara T, Mendoza ES, Altamirano A, Oliva D, Trejo R, Hernández-Baugartem E, et al. Evaluación serológica de las pruebas de ELISA y Neumotest en cerdos vacunados con bacterina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* comercial. XXXIV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos; (2004), julio 28-agosto 1º; Mazatlán, (Sinaloa) México: 238.
- 36.- Mendoza SE y Ciprian, A: Aplicación de la serología para el diagnóstico y control de las enfermedades del "Complejo Respiratorio Porcino" www.engormix.com/MA-porcicultura/sanidad/articulos/aplicacion-serologia-diagnostico-control-t186/165-p0.htm (2002). 56
- 37.- Dreyfus A, Schaller A, Nivoller S, Segers RP, Kobisch M, Mieli L. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. Vet Microbiol. (2004);99:227-238
- 38.- Mittal KR, Higgins R, Lariviere S, Leblanc D. A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Am J Vet Res (1984);45:715-719.

- 39.- Ajito T, Haga Y, Homma S, Goryo M, Okada K. Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. J Vet Med Sci (1996); 58:297-303.
- 40.- Gram T., Ahrens P., Nielsen J.P., Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus Pleuropneumoniae* In Mixed Bacterial Cultures From Tonsils, Vet. Microbiol. (1996); 51:95–104
- 41.- Ruiz, A. Muñoz, D. Quezada, M. Estudios de pleuroneumonía contagiosa porcina en Chile. Rev.Porcic. Iberoam. (2011) 1:4.
- 42.- Marstseller TA. Fenwick, B. *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. Swine Health Prod. (1999) (7) : 161-165.
- 43.- Muirhead, MR, Alexander TJL.. Managing and treating disease in the weaner, grower and finishing periods. (2007) In Managing Pig Health and the Treatment of Disease, p. 294. Sheffield: 5 M Enterprises Ltd.
- 44.- Sjölund, M, Zoric M, Persson M, and Wallgren P: Maternal protection to infections caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* effects of the immune status of the dam. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, Germany, (2004) 409.
45. Alcantara Guadarrá Tania. (2007). Evaluación serológica en cerdos vacunados con bacterina de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Tesis Licenciatura de QFB,
46. Rodríguez-Ferri, EF., Barceló, J., Gómez, S. y Sánchez-Vizcaíno, J.M. La pleuroneumonía porcina es una de las enfermedades bacterianas más importantes de cuantas afectan al tracto respiratorio del ganado porcino. INTERBIONET. Investigación, Educación e Internet. info@interbionet.com - Madrid - España