



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLÓGICO  
CUAUTITLAN



PERFIL SEROLOGICO DE PLEURONEUMONIA USANDO LA  
PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMOLISINA DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ApXI)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A  
ARMANDO ARROYO RAMIREZ

DIRECTORES  
DR. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

ASESOR  
Q.F.B. OSCAR TORRES ANGELES



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

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

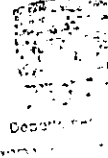


UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



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

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

Perfil serológico de pleuroneumonía usando la prueba de inhibición de la hemolisina de Actinobacillus pleuropneumoniae (ApXI).

que presenta el pasante: Armando Arroyo Ramirez  
con número de cuenta 7601799-9 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considero que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlan, Edo. de Méx., a 5 de Marzo de 2001.

PRESIDENTE	<u>M. V. Z. Tonatihu Cruz Sánchez</u>
VOCAL	<u>Dr. Abel Ciprián Carrasco</u>
SECRETARIO	<u>M. en C. Sofia González Gallardo</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Victor M. Zendejas Buitrón</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Angel Germán Martínez Sosa</u>

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi padre Adalberto Arroyo Ríos, quien aunque no logro verme titulado, nunca perdió la esperanza de que así fuera, por sus enseñanzas y su gran amor le dedico esta tesis.

A la Dra. Susana Mendoza, por su gran amistad y ayuda brindada para la conclusión de este trabajo que sin su guía no hubiera podido ser finalizada.

Al Dr. Abel Ciprián, por compartir sus conocimientos conmigo e impulsarme al éxito.

A mi madre por su amor y entrega, por darme lo más valioso que tengo, la vida.

A mi esposa por su cariño y apoyo porque sigamos este camino juntos.

A mis hijos especialmente para que en sus vidas siempre concluyan lo que empezaron.

Al MVZ David Trujillo por su apoyo en computación, a Carolina García por su apoyo secretarial y al Sr. Gabino Sánchez por su apoyo técnico.

Este trabajo fue desarrollado en las instalaciones de los Laboratorios de Virología y de Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo, bajo la Dirección de Dr. Susana Mendoza Elvira y Dr. Abel Ciprián Carrasco y con la asesoría del Q.F.B. Oscar Torres Angeles.

# INDICE

	PAGS
Resumen.....	i
<b>1.0 INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1 ANTECEDENTES.....	2
1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS .....	2
1.3 y 1.4 DISTRIBUCION E IMPORTANCIA.....	3
1.5 EPIDEMIOLOGÍA.....	6
1.6 MORBILIDAD Y MORTALIDAD.....	6
1.7 TRANSMISIÓN.....	6
1.8 PATOGENIA.....	7
1.8.1. FACTORES DE PATOGENICIDAD.....	7
1.8.1. CÁPSULA.....	7
1.8.2 FIMBRIAS CITOADHERENTES.....	8
1.8.4 LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS).....	8
1.8.4 PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA.....	10
1.8.5. EXOTOXINAS.....	11
1.8.6. PROTEASAS.....	11
1.9. SIGNOS CLÍNICOS.....	12
1.10. LESIONES A LA NECROPSIA.....	13
1.11 LESIONES MICROSCÓPICAS.....	18
1.12. TRATAMIENTO Y CONTROL.....	18
1.13 VACUNACIÓN.....	15
1.13. DIAGNÓSTICO.....	16
1.13.1 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	16
1.13.2. METODOS DE DIAGNÓSTICO PARA LA PCP.....	17
1.13.3. PRUEBAS SEROLÓGICAS.....	18
1.13.3.1 PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO (FC) .....	18
1.13.3.2 PRUEBA DE ENZIMA LIGADA A INMUNOABSORBENTE (ELISA).....	19
1.13.3.4. PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN.....	19
1.13.3.5. AGLUTINACIÓN EN TUBO.....	19
1.13.3.6. PRUEBA DE LA NEUTRALIZACIÓN DE LA HEMOLISINA.....	19
1.13.4. SITUACION DEL DIAGNÓSTICO DE LA PCP EN MÉXICO.....	20
1.13.5. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN PLACA DENOMINADA "PLEUROTTEST".....	20
1.13.5.1. EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA.....	21
1.13.5.2. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO.....	21
1.13.6. SELECCIÓN DE LA MEJOR PRUEBA DIAGNOSTICA.....	22
1.13.3.7. La prueba 2-ME-TA y ELISA .....	26
<b>2.0. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>27</b>
2.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
2.2. HIPÓTESIS: .....	27
<b>3.0 MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. Granjas: .....	28
3.2 Vacuna.....	29
3.3 Muestreo.....	29
3.4. Cultivo: .....	30
3.5. Purificación de la hemolisina: .....	30
3.6. Prueba de la inhibición de la hemolisina: .....	31
3.7. Prueba de Aglutinación .....	31
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>5.0 DISCUSION.....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>41</b>

## RESUMEN

Con la finalidad de utilizar la prueba de inhibición de la hemolisina (IHem), a partir de un cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, se separó y se concentró la toxina hemolítica ApXI. La aplicación de la prueba para la realización del perfil serológico de dos granjas una vacunada y la otra infectada; para así comparar los resultados con la prueba de aglutinación PLEUROTTEST, que identifica anticuerpos capsulares de los diferentes serotipos. Para el estudio se seleccionaron un total de 428 sueros que fueron colectados y probados. Se muestrearon dos granjas, una de animales vacunados y otra de no vacunados. En la granja "A" las muestras fueron colectadas a las 6, 8, 14, y 16 semanas de edad, los animales fueron vacunados con un inmunógeno a base de un toxoide comercial de ApXI, Apx II y Apx III en adyuvante y se vacunaron en la semana 6 y la semana 14. La muestra de la semana 6 fue considerada tiempo cero y se obtuvieron un total de 204 sueros de la granja. Para la granja "B" se colectaron 220 sueros para el mismo periodo, se vacunaron en la semana 6 y en la semana 11, por vía intramuscular y subcutánea respectivamente. La muestra de la semana 6 se consideró como tiempo cero. El título de anticuerpos contra la citolisina ApX I fue determinada por la prueba de inhibición de la hemolisina. Los sueros también fueron probados con la prueba de aglutinación PLEUROTTEST para serotipificar al *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En la granja "A" la prueba de aglutinación identificó anticuerpos maternos contra los serotipos 1 y 5 a partir de la sexta semana, mientras que solo hasta la 16ª semana los cerdos tuvieron sus propios anticuerpos y fueron detectados solo para el serotipo 1. En el caso de los anticuerpos IHem para los grupos vacunados y no vacunados se observó el mismo comportamiento, así para la semana 6 se tuvo  $10^{2.2}$  y para la semana 16 de  $10^{2.8}$ . Para la granja "B" en el tiempo cero no se detectaron anticuerpos contra los serotipos incluidos en PLEUROTTEST (1, 3, 5 y 7), únicamente en la 11ª semana se detectaron los serotipos 1 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, mientras que en la 13ª semana fue detectado únicamente el serotipo 1. En el caso de los anticuerpos IHem en los cerdos vacunados subcutáneamente e intramuscularmente, en la semana 8 se encontró  $10^{3.6}$ , en todos los grupos vacunados por vía SC tuvieron el mismo título en las semanas 6, 11 y 13 y fue en forma ascendente. Con la prueba de aglutinación los anticuerpos de los animales infectados comenzaron a ser detectados, cuando ya tenían daño en el pulmón. Posiblemente con la prueba de IHem se detectó la infección en la semana 8 y 14 de la granja "A" y en la semana 8 y 11 en la granja "B" etapas en las que fueron vacunados con el toxoide comercial.

## 1.0 INTRODUCCION

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP), producida por el *Actinobacillus pleuropneumoniae* es una enfermedad devastadora de los cerdos que produce pérdidas económicas importantes, debido a una pobre conversión alimenticia en los animales infectados crónicamente. La enfermedad puede variar desde un caso hiperagudo hasta el crónico, en dónde la lesión aguda es característica de una neumonía hemorrágica, necrosante, asociada a una pleuritis fibrinosa; en tanto que la lesión crónica se distingue por el tejido pulmonar consolidado, infartado y encapsulado (42, 52, 59).

Debido a la alta demanda de ganado porcino, el incremento de la producción y la diversa procedencia de los animales; las granjas mexicanas porcícolas se han visto afectadas teniendo la necesidad de reducir sus espacios. Por lo que en las mismas se han disminuido las enfermedades infecciosas, sobre todo aquellas cuyo contagio es por contacto directo. Haciendo énfasis en las enfermedades respiratorias como en el caso de la PCP, donde se considera que entre el 30-60% de los cerdos de abasto presentan alguna lesión neumónica (36).

En México se ha reportado la presencia de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* predominando el serotipo 1 (4,12).

Por otro lado, se han identificado tres distintos tipos de citotoxinas en *Actinobacillus pleuropneumoniae* Citolisina I (antes Cly I, hoy ApX I), Citolisina II (antes Cly II, hoy ApX II) y Citolisina III (antes Cly III, hoy ApX III). Se ha encontrado que la citolisina I la producen los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11; la citolisina II es excretada por todos los serotipos excepto el 10 y la citolisina III solo la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 12 (17, 37).

Para el diagnóstico de la PCP se cuenta con las siguientes pruebas: aglutinación, aglutinación con partículas de látex, aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol, hemoaglutinación indirecta, fijación de complemento y prueba de ELISA, mismas que requiere de personal especializado para realizarlas (22, 34, 38, 43, 71).

En México se ha desarrollado una prueba de diagnostico denominada PLEUROTTEST para la determinación de anticuerpos contra los serotipos 1,3,5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* siendo una prueba de aglutinación rápida que se emplea en el campo como de rutina (5).



En la actualidad se han desarrollado pruebas para la determinación de anticuerpos en contra de las citólisin; una de ellas es el ensayo de la inhibición de la hemólisis en agar sangre, denominada BAHIA por las siglas de Blood Agar Hemolysis Inhibition Assay (69).

## 1.1 ANTECEDENTES

En California (USA) en cerdos con signos neumónicos se aisló una bacteria que para su crecimiento necesitaba factor de crecimiento: factor V (nicotinamin adenosin di nucleótido N.A.D.) produciendo hemólisis en agar sangre denominándole *Haemophilus parahemolyticus*. En Argentina 1963 Shope investigó un brote de pleuroneumonía de tipo agudo en cerdos y se denominó *Haemophilus pleuropneumoniae* (47,63).

Basándose en los estudios de hibridación de DNA la bacteria *Haemophilus pleuropneumoniae* se ha reubicado en el género de Actinobacillus denominándosele *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Y por sus requerimientos de NAD para su crecimiento se han definido dos biovariedades, la biovariedad 1 que requiere este factor y la biovariedad 2 que no lo requiere (53).

## 1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

*Actinobacillus pleuropneumoniae* es una bacteria del tracto respiratorio con un alta especificidad hacia su hospedero, es una bacteria pleomórfica que se observa generalmente como pequeños bastones Gram negativo, capsulados de aproximadamente 0.5 a 1.5 um de largo por 0.3 um de diámetro, inmóviles no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, crecen en medios enriquecidos que contienen factor V (NAD), pero no requieren factor X (hemina). Por su necesidad del factor V crece en la proximidad de colonias de *Staphylococcus aureus*, fenómeno que se conoce como satelitismo. Fermenta la mayoría de los carbohidratos excepto: sorbitol, ducitol y meso-inositol; no utiliza los citratos, no produce ácido sulfhídrico, e indol; degrada la urea y los nitratos, presenta reacción dudosa a la catalasa y oxidasa. (Tabla 1) (10, 32).

**Cuadro 1. Características bioquímicas de *A. pleuropneumoniae*.**

Factor V	+
Factor X	-
Catalasa	+
Nitratos	+
Oxidasa	<b>d</b>
Urea	+
Indol	-
Citratos	-
Hemolisina B	+
Xilosa	+
Dextrosa	+
Fosfatasa alcalina	+
Factor V = NAD	
Factor X = Hemina	
<b>d</b> = dudosa	

La existencia de varios serotipos de esta bacteria fue determinada por los estudios de aglutinación cruzada de Nicolet el cual definió tres serotipos basándose en los antígenos de tipo específicos asociados a la cápsula (lábil y resistentes al calor) (41). Esta clasificación fue ampliada por Gunnarson quien descubrió los serotipos 4 y 5; y Nielsen y Rosendal quienes propusieron la existencia de los serotipos 6 y 7 respectivamente. En la actualidad se reconocen mundialmente 12 serotipos. ( 23, 45, 46, 56).

### 1.3 Y 1.4 DISTRIBUCION E IMPORTANCIA

La PCP está ampliamente distribuida en el mundo y su importancia epizootológica está correlacionada estrechamente con la industrialización de la producción del cerdo, fue primeramente reportada en: Inglaterra, Argentina y en los Estados Unidos. Posteriormente fue reportada en prácticamente todos los países Europeos, en Estados Unidos, Canadá y México. En el Cuadro 2 observamos la distribución de la bacteria en el mundo (33, 35).

**Cuadro 2. Distribución Geográfica de *A. pleuropneumoniae***

País	serotipo (s) prevalente (s)	Serotipo (s) Denominantes (s)	Referencias
Argentina	1,2,3,5	1	Vena et al. (1988)
Australia	1,2,3,7,UT	1	Eaves and Blackall (1988)
Bélgica	2,3,6,7,8,9,11,UT	3	Hommez et al. (1988, 1990)
Brasil	1,3,4,5, UT	5	Piffier et al. (1986, 1987)
	1,2,3,5,6,7,8, 10,11,12	1,5	Rosendal et al. (1982). Mittal et al (1982)
Chile	1,5	1,5	Olivares and Morgado (1988)
Checoslovaquia	1,2,7	2	Skollova and Gois (1987)
Dinamarca	1,2,3,5,6,7,8, 10,11,12	2	Nielsen (1982, 1987)
Francia	2,3,7,,8,9	9	Kobisch (1990) (comunicación personal)
Alemania	2,3,4,5,6,7,8, 10,11,12	2,7,9	Schimmel and Hass (1983) Muller et al. (1986)
Hungría	1,2,3,5,6,7,10,11,12	1,2	Foodor et al. (1987) Molnar (1990)
Italia	1,2,3,4,5,7	5	Menzat et al. (1987) Sidoli et al. (1987)
Irlanda	3, TU	3	Power et al (1983)
Japón	1,2,3,5,6,7,8,9,12	2	Chan et al (1978) Kume et al. (1996) Fukuyasu et al. (1987)
Corea	2,3,5,7	2,5	Yeh (1990)
México	1,2,3,4,5,6,7,8,9	1	Diaz et al. (1988) Ciprián et al. (1988)
Holanda	1,2,3,4,5,7,8,9,11	2,9,11	Kamp et al. (1987)
Noruega	2	2	Falk et al. (1991)
Polonia	1,2,5,9	1	Molenda (1988) Tarasiuk
España	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,	4	Ferry et al. (1990)
Suecia	2,3,4	2	Gunnarsson (1979)
Suiza	2,3,7,9	2	Nicolet (1988)
Reino Unido	1,2,3,5,6,7,8,10	3	Hunter et al. (1983) Brandeth and Smith (1985)
Estados Unidos	1,3,5,7,8,9	1,5	Schultz et al. (1983) Rapp et al. (1985) Hoffman et al. (1985) Fales (1989)

Adaptado de (35)

En México, prácticamente no existe zona con porcicultura intensiva en donde no se haya reconocido la enfermedad, consecuentemente su significado económico es muy alto. Aunque no existen estudios publicados que precisen la cuantía de las pérdidas que ocasiona, se ha estimado que los brotes agudos de neumonía causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* puede matar 20-30% de los cerdos y reducir las ganancias de peso y conversión alimentaria en 30% (8, 48).

Debido a la severidad de los casos en nuestro país, Pijoan y cols (48) decidieron hacer un trabajo de investigación sobre la etiología de este problema. El estudio fue realizado en dos granjas localizadas en el estado de Michoacán y Tlaxcala. Se sacrificaron 29 animales de edades entre 2 y 6 meses que presentaban signos avanzados de enfermedad respiratoria, de la zona de Tlaxcala y de la Piedad Michoacán. En 3 (50%) de los pulmones provenientes de Tlaxcala y 5 (21.7%) de la Piedad, se obtuvo crecimiento de colonias beta hemolíticas que fueron clasificadas como *Haemophylus parahemolyticus (pleuropneumoniae)*.(6)

En otro trabajo realizado en el mismo año Díaz y cols. (12) reportaron la presencia de los serotipos 1,2,3,4,5,6,7,8, y 9. La distribución de los serotipos en el país se muestra en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Distribución nacional de los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae***

ESTADO	SEROTIPO
México	1a, 5
Guanajuato	1a, 4, 5
Jalisco	1a, 2, 3, 5, 8
Michoacán	1a, 5, 6, 7
Puebla	1a, 2, 3, 4, 5
Querétaro	1a
Sonora	1a
Yucatán	5

- Información solo en estados
- serotipo predominante

Fuente: Díaz y cols. 1992.

## 1.5 EPIDEMIOLOGÍA

*Actinobacillus pleuropneumoniae* es transmitido por vía respiratoria, los animales enfermos crónicamente lo dispersan cuando son introducidos en piaras que no han tenido exposición previa y son los responsables de brotes severos con altos índices de morbilidad y mortalidad (44, 57, 59). Después de que sucede un brote es frecuente descubrir que nuevos animales fueron adicionados o que los ya existentes fueron movidos antes de la aparición de los primeros signos del brote. Lo más frecuente es que se compran nuevos animales, lo que implica un aumento del movimiento de los mismos aumentando el grado de infección (51, 59). Los brotes han sido asociados con estrés, sobrepoblación, mala ventilación y alta humedad. Los portadores sanos han sido asociados con brotes que se presentan en piaras de ciclo cerrado (54).

## 1.6 MORBILIDAD Y MORTALIDAD

La evaluación de la morbilidad y mortalidad de los brotes mexicanos, se han caracterizado por los siguientes hechos:

- a. Varía según la edad de los animales.
- b. Puede alcanzar en el lote afectado hasta un 80%, en tanto que la mortalidad, aún con la administración de tratamiento puede ser hasta del 35%.
- c. La mayoría de los brotes detectados han sido en animales de 30 a 50 Kg de peso.
- d. Ocasionalmente se difunde a animales adultos.

## 1.7 TRANSMISIÓN

La transmisión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se lleva a cabo fundamentalmente por contacto directo, este modo de transmisión se intensifica cuando:

- a- Se utilizan corrales o jaulas que permiten el contacto.
- b- Se mezclan constantemente animales de diferentes grupos.

El brote se presenta súbitamente y se detecta por la muerte de algunos cerdos en la granja, el periodo de incubación de la enfermedad es corto, experimentalmente de menos de 6 hrs; aunque en condiciones de campo entre 12 y 24 hrs. (61, 62).

## 1.8 PATOGENIA

La patogenia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* es poco conocida, sin embargo, se ha demostrado que se encuentran relacionados varios factores. Las investigaciones sugieren que la endotoxina es la responsable de los cambios patológicos iniciales y que las citolisinas son citotóxicas para los macrófagos alveolares, posteriormente los complejos antígeno-anticuerpo destruyen el endotelio vascular causando vasculitis y trombosis. Estos daños resultan en edema, infarto, necrosis, y hemorragia que son características de la PCP (13, 49, 59).

### 1.8.1. FACTORES DE PATOGENICIDAD

#### 1.8.1. CÁPSULA

La cápsula es la responsable de la especificidad del serotipo, en el presente se reconocen doce serotipos designados con números arábigos del 1 al 12. Los estudios sobre antígenos empleados para el diagnóstico serológico han demostrado que la cápsula es el más adecuado para tal propósito, debido a que la estructura química de ésta macromolécula es única en cada uno de los serotipos, excepto en el serotipo 5 que se ha subdividido en 5<sup>a</sup> y 5b (15).

Dentro de las propiedades biológicas de la cápsula se mencionan las siguientes: son inertes, no tiene actividad tóxica (como la reacción de Schwartzman), tampoco tiene actividad pirogénica. Sin embargo, se ha encontrado que mata al embrión de pollo, presenta actividad blastogénica linfocitaria, debido a la carga negativa que confiere la cápsula hay resistencia a la fagocitosis por neutrófilos (PMN), es opsonizado por los anticuerpos e interfiere con la actividad del complemento hacia la membrana (11,15).

Los anticuerpos generados contra la cápsula, solo protegen contra la muerte, pero no contra las lesiones pulmonares y a la infección crónica. La virulencia atribuida a la cápsula es variable entre los diferentes serotipos, y aunque es requerida para que *Actinobacillus pleuropneumoniae* sea virulento, aún no se conoce por completo el papel patogénico de la cápsula (39).

### 1.8.2 FIMBRIAS CITOADHERENTES

En México se han realizado una serie de trabajos que mostraron que cuando se inocularon por nebulización con *Actinobacillus pleuropneumoniae* (en una cámara de aerosoles) a cerdos, conejos, ratones y cuyes, solo los cerdos se infectaron y murieron con inóculos que variaron de  $2 \times 10^4$  hasta  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Estas evidencias muestran la alta especificidad de *Actinobacillus pleuropneumoniae* hacia el cerdo, sugiriendo probablemente, que posee receptores específicos hacia el factor de adherencia de esta bacteria (65).

En otros estudios se han identificado en *Actinobacillus pleuropneumoniae* estructuras semejantes a fimbrias o pillis citoadherentes, denominados adhesinas. Sin embargo, no se han encontrado estos apéndices extracelulares en *Actinobacillus pleuropneumoniae* cultivados *in vitro* y al parecer estos apéndices la bacteria solo los expresa en el cerdo. Se han identificado estas estructuras mediante microscopía electrónica y estudios de patogenicidad en cerdos libres de patógenos específicos (SPF), en dónde se muestra que *Actinobacillus pleuropneumoniae* tiene y presenta factores de adherencia o pillis que solo se mantienen en los primeros pases de la bacteria en medios de cultivo *in vitro* (68).

Garibay y cols, en 1993 encontraron fimbrias de 2 nm, no obstante que también encontraron otras fimbrias de 2 a 7 nm de diámetro, lo cuál sugiere que *Actinobacillus pleuropneumoniae* está expresando dos clases de estructuras fimbriales que ya se habían encontrado en *Escherichia coli*, una “rígida” que tiene un diámetro de 2 a 5 nm y que está involucrada en la conjugación y la otra “flexible” con un diámetro de hasta 2 nm, involucrada únicamente en la adherencia, al igual que en el estudio anterior estas estructuras se fueron perdiendo en los pases subsecuentes (19).

### 1.8.4 LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS)

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar una membrana externa, que estructuralmente es idéntica a la membrana celular o interna, sólo que en la membrana externa o envoltura celular se encuentra enclavado el LPS. En *Actinobacillus pleuropneumoniae* se encuentra un antígeno somático denominado “O”, situación que no ocurre con las bacterias del género *Haemophilus* (20).

La estructura del antígeno "O" es variable entre los diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se componen principalmente de glucosa, galactosa, ramnosa, azúcares aminados como la N-acetilglucosamina y la N-acetilgalactosamina. El antígeno "O" es el responsable de las reacciones cruzadas entre los serotipos 1,9 y 11 porque comparten el mismo antígeno "O:1", el serotipo 2 el antígeno somático "O:2", con respecto a los serotipos 3,6 y 8 estos comparten el antígeno "O:3", lo mismo sucede con el serotipo 4 que cruza con el 7 porque comparten el antígeno "O:4"; en éste caso del serotipo 5 (5a y 5b), este posee el antígeno "O:5"; mientras que el serotipo 10 posee el antígeno "O:6" y el serotipo 12 el "O:7" (Cuadros 4 y 5 ) (20).

Las propiedades biológicas del LPS se resumen en las siguientes actividades: tienen la actividad biológica clásica de una endotoxina de los Gram negativos; el LPS de *Actinobacillus pleuropneumoniae* gelifica a los amebocitos de *Limulus*, cuando se inocula por vía intradérmica se produce una reacción de Schwartzman; también el LPS actúa como un pirógeno. El LPS de los diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* induce una infiltración de las células inflamatorias cuando se inocula a ratones y cerdos por vía respiratoria, observándose una neumonía intersticial multifocal y no la neumonía fibrinohemorrágica necrótica clásica de la PCP (21).

Cuadro 4.- Antígenos somáticos encontrados en *Actinobacillus pleuropneumoniae* y los serotipos que lo contienen.

<i>Antígeno</i>	<i>Serotipos que lo presentan</i>
0:1	11,9,11
0:2	2
0:3	3,6,8
0:4	4,7
0:5	5 <sup>a</sup> ,5b
0:6	10
0:7	12



Cuadro 5. Antígenos somáticos encontrados en *Actinobacillus pleuropneumoniae* y los serotipos que los contienen (21).

SEROTIPO	SEROGRUPO
1	0 :1
2	0 :2
3	0 :3
4	0 :4
5	0 :5
6	0 :3
7	0 :4
8	0 :3
9	0 :1
10	0 :6
11	0 :1
12	0 :7

#### 1.8.4 PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA

El perfil de las proteínas localizadas en la membrana externa se ha estudiado en todos los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, basándose en la movilidad electroforética de estas proteínas, la migración ocurrió de la siguiente manera: en las regiones de 39 a 44 Kilodaltones (Kd); de 16 a 16.5 Kd y la región de 29 Kd correspondiente a una proteína modificable por calor, por lo que se han identificado 7 patrones de nueve serotipos probados. (20).

Las proteínas de la membrana externa de los serotipos 1 y 9 fueron idénticas (estos serotipos presentan reacción cruzada por sus antígenos somáticos), los serotipos 2 y 6 (estos serotipos no cruzan por sus antígenos capsulares), los serotipos 3,4,5,7 y 8 presentan perfiles diferentes (estos serotipos sólo cruzan por sus antígenos somáticos de la siguiente manera: el 3 con el 8, el 4 con el 7 y el 5 no cruza con los demás) (20).

### 1.8.5. EXOTOXINAS

En los sobrenadantes de los cultivos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se ha encontrado actividad tóxica sobre diferentes células, tales como linfocitos, macrófagos alveolares y principalmente, contra eritrocitos, esta actividad funcional ha determinado que a esos factores tóxicos se les denominen “hemomilisinias” o “citolisinias”. (39,42) Las toxinas que libera *Actinobacillus pleuropneumoniae* se han clasificado en la familia de toxinas denominadas RTX (Repeat of Toxin) y las producidas particularmente por este microorganismo se han designado como ApX (*Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Toxin*) (17).

Se han identificado tres distintos tipos de citolisinas en *Actinobacillus pleuropneumoniae*: citolisina I (antes ClyI, hoy AXxl), citolisina II (antes ClyII, hoy ApXII), citolisina III (antes ClyIII, hoy ApXIII). Se ha encontrado que la citolisina I, la producen los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11; la citolisina II es excretada por todos los serotipos excepto el 10 y la citolisina III solo la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8 (17,28).

Estas hemolisinas no muestran diferencias antigénicas entre serotipos, aunque son antigénicamente diferentes entre ellas. La actividad hemolítica de esta proteína es probablemente la responsable de las lesiones iniciales de la PCP, caracterizada por ser hemorrágicas y necróticas. (17).

### 1.8.6. PROTEASAS

El papel de las proteasas secretadas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* como un factor de patogenicidad ha sido poco estudiada. Kilian and Messtecky (29) demostraron la presencia de proteasas capaces de romper la inmunoglobulina IgA en un trabajo en el cuál estudió 37 cepas de *Haemophilus*, encontrando que sólo las cepas de *Haemophilus influenzae* y de *Actinobacillus pleuropneumoniae* fueron capaces de degradar la IgA1 secretoria porcina, pero no degradaban la IgA secretoria humana (40). Los factores de patogenicidad de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se resumen en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Factores de patogenicidad asociados a *Actinobacillus pleuropneumoniae* (40)**

Estructura celular o molecular	Función	Composición	Referencia
Fimbria	Adhesión	Proteínas	57
Cápsula	Evadir la fagocitosis	Polisacárido	26
Hemolisinas o citolisinas	Lisis de eritrocitos	Proteínas	8,10
Proteínas de membrana externa	Choque endotóxico	Lipolisacárido	53
Receptores	Captador de hierro	Proteínas	22
Proteasas	Degradación de IgA	Proteínas	30,38

### 1.9. SIGNOS CLÍNICOS

La muerte súbita sin signos clínicos o lesiones externas es común en los casos hiperagudos en las infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, ocurre generalmente en cerdos en buenas condiciones. Si los signos clínicos se observan estos incluyen fiebre alta, apatía, anorexia, diarrea acuosa, vómito y epitaxis pueden ocurrir, especialmente como fase terminal o subterminal (13, 44, 59).

Los signos clínicos de la fase aguda son respiración por el hocico, disnea, tos, depresión, fiebre y anorexia. Una alta morbilidad y mortalidad en los cerdos que no han tenido exposición previa al *Actinobacillus pleuropneumoniae* y las infecciones se vuelven enzooticas en los animales que se recuperan de la fase aguda (44, 57,59).

Los signos clínicos de la fase subaguda o crónica de la enfermedad no son específicos: los cerdos pueden tener poca fiebre o no presentarla, disminuye su apetito, disminuye su ganancia de peso y rara vez mueren. Las infecciones subclínicas son comunes, resultando en una baja conversión alimenticia, baja tasa de crecimiento, retarda su comercialización e incrementa los costos de producción (1,44).

La inspección en rastro de las piaras con infecciones subclínicas revelan un alto decomiso de las carcasas y una alta incidencia de lesiones crónicas pulmonares y pleuritis crónica (44).

#### 1.10. LESIONES A LA NECROPSIA

Lesiones características postmortem de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en los cerdos son encontradas en el tracto respiratorio y en la cavidad torácica. Las cavidades pleural y pericardial pueden contener hasta 2 litros de líquido sero-sanguinolento y exudado fibrinoso amarillento. Las lesiones pulmonares generalmente son bilaterales y difundidas a través del pulmón. Los lóbulos apical, cardíaco y el área craneodorsal del lóbulo diafragmático generalmente están involucrados (30,44, 61).

En el estudio donde los cerdos fueron infectados con un aerosol de *Actinobacillus pleuropneumoniae* los lóbulos diafragmáticos fueron mas severamente afectados que los otros. En los casos agudos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* las lesiones son hemorrágicas, fibrinosas y necróticas. Una acumulación de fibrina, edema y hemorragia son encontradas en los espacios pleurales y subpleurales. Los lóbulos afectados están edematosos con áreas rojo oscuras de consolidación (62).

La pleuritis, necrosis y adherencias son características en los animales infectados crónicamente. Las lesiones pulmonares son oscuras, menos rojizas, firmes, mas necróticas que las lesiones en los animales infectados agudamente y están bien delimitados por tejido conectivo, aumento de volumen y edema de los ganglios linfáticos submandibulares, bronquiales, cervicales, mediastínicos y pulmonares; son las lesiones comunes postmortem. La tráquea y bronquios están llenos de espuma, líquido sanguinolento y fibrina (1,44, 58, 61).

#### 1.11 LESIONES MICROSCÓPICAS

Las lesiones microscópicas de los pulmones infectados en forma aguda con *Actinobacillus pleuropneumoniae* son lesiones típicas de la pleuroneumonía aguda, necrotizante y fibrinohemorrágica. Los capilares alveolares están dilatados y llenos de eritrocitos, trombocitos y ocasionalmente trombos de fibrina. Las paredes vasculares y

el canal vascular pulmonar están necrotizados y están asociados con edema inflamatorio, exudado serofibrinoso y células mononucleares (1,13).

El septo interlobular y los bronquiolos presentan infiltración con macrófagos, linfocitos, edema, fibrina y sangre. Los alvéolos contienen sangre, edema fluido con alto contenido de proteínas y células epiteliales alveolares exfoliativas. El parénquima pulmonar está congestionado con infiltración y exudación de células mononucleares. Hay pequeñas áreas de con isquemia de ambos lóbulos(13).

### 1.12. TRATAMIENTO Y CONTROL

En los últimos años las estrategias de control se han enfocado sobre los principios fundamentales de la producción, diseñados para limitar la transmisión del organismo y la optimización de la resistencia. El tratamiento es un costo que impacta económicamente en forma importante. La inyección masiva del cerdo, es difícil y consume tiempo. La ventaja de la terapia es la reducción de la mortalidad, sin embargo hasta ahora el alto costo económico del pobre crecimiento de los animales recuperados durante la recuperación de las lesiones es substancial y casi siempre excede los costos por muertes en el tratamiento. La medicación en el alimento tiene poco valor en un brote, porque los cerdos presentan anorexia, y es difícil obtener niveles terapéuticos apropiados por esa vía. Otras medidas son: limitar el estrés, no mezclar animales, mantener condiciones favorables de temperatura, adecuada ventilación, limitar la cantidad de polvo y reducir la densidad porcina (3).

En México y otros países es común la resistencia a penicilinas y tetraciclinas. En Estados Unidos los análogos de penicilina son generalmente efectivos; pero el patrón de la infección en la granja dificulta su uso. En resumen la resistencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a sulfonamidas, tetraciclinas, neomicina, estreptomycinina y también se han reportado resistencia a lincomicina, cloxacilina, penicilina y ampicilina (14, 25).

En los casos de un brote agudo, puede inyectarse un antibiótico de amplio espectro. Los animales afectados usualmente están anoréxicos y el consumo de agua normalmente también se reduce, de tal manera que la aplicación parenteral es más efectiva. Con frecuencia el agua es medicada para prevenir la difusión de la infección, si

se puede medicar el alimento cuando no puede ser medicada el agua. La vacunación y la medicación modifican el cuadro clínico, sin embargo no eliminan el agente ni evitan el desarrollo de casos crónicos o subclínicos de la infección (18, 25).

### 1.13 VACUNACIÓN

La PCP puede ser controlada por vacunación o por programas basados en el diagnóstico serológico. Estas medidas requieren del conocimiento de los serotipos prevalentes en el área; sin embargo las vacunas con la capacidad de inducir inmunidad protectora confiable contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* no están disponibles comercialmente. Algunas reducen la mortalidad, pero ninguna es efectiva para prevenir la infección con *Actinobacillus pleuropneumoniae* o el desarrollo de cerdos portadores capaces de eliminar la bacteria (16, 44, 55).

No es posible controlar a *Actinobacillus pleuropneumoniae* con una sola vacunación, especialmente en granjas altamente expuestas. La vacunación con vacunas comerciales que contienen los serotipos prevalentes en un lugar pueden prevenir la mortalidad, pero no la infección, el descenso en el índice de crecimiento y las lesiones macroscópicas (64).

Las vacunas que contienen gel de hidróxido de aluminio como adyuvante no han probado ser eficaces; aunque las vacunas con adyuvantes oleosos estimulan una respuesta de anticuerpos más completa, ellas producen también una extensa reacción granulomatosa. Se ha investigado un adyuvante oleoso basado en aceite de cacahuete que es mucho menos irritante, pero su capacidad de incrementar la respuesta inmune no ha sido investigada completamente. Lo mejor que se puede esperar con el uso de las vacunas actuales es la reducción de la severidad y de la muerte. Las vacunas son más efectivas cuando están hechas con el serotipo que causa la enfermedad clínica (45).

## 1.13. DIAGNÓSTICO

### 1.13.1 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Los casos hiperagudos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* deben ser diferenciados de otros casos de muerte repentina de cerdos jóvenes en buenas condiciones, esto incluye el envenenamiento por sal, deficiencia de vitamina E/selenium, infecciones por *Haemophilus parasuis*, síndrome de estrés porcino, ulceración gástrica, síndrome hemorrágico intestinal, torción intestinal y salmonelosis sistémica. Todas estas condiciones excepto la respiratoria de *Haemophilus parasuis* son fácilmente diferenciables de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por las lesiones macroscópicas a la necropsia. Generalmente *Haemophilus parasuis*, afecta otros sistemas causando artritis, pericarditis y meningitis. Los signos y la historia clínica junto con los resultados de la bacteriología y la histopatología son útiles para la elaboración del diagnóstico diferencial (42).

Los casos agudos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* tienen una historia clínica y las lesiones macroscópicas patológicas son sugestivas si no son “patognómicas”. Un diagnóstico tentativo puede ser elaborado e iniciar un tratamiento basado en las lesiones macroscópicas y la historia clínica (42).

El aislamiento bacteriológico y la identificación son necesarios para confirmar el diagnóstico (21,50). Los casos agudos, subagudos o crónicos pueden ser diferenciados de otras causas de disnea, tos y retraso en el desarrollo en los cerdos en etapa de crecimiento y finalización. Otros agentes o causas que pueden ocasionar cuadros similares pueden ser *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus sp*, enfermedad de Aujeszky, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, influenza porcina, *Ascaris spp* y especies de *Metastrongylus*, pero no son los únicos. Usando los métodos de diagnóstico descritos anteriormente se pueden diferenciar las infecciones de *Actinobacillus pleuropneumoniae* con las antes mencionadas (42).

### 1.13.2. METODOS DE DIAGNÓSTICO PARA LA PCP.

El diagnóstico definitivo de la PCP debe ser oportuno y rápido siendo esencial identificar los diferentes serotipos prevalentes en el país, para elaborar así los biológicos adecuados para el diagnóstico de la PCP se emplean cuatro métodos:

- 1) Observación de los signos clínicos en el cerdo y en los de la zahurda.
- 2) Observación de las lesiones a la necropsia de los animales muertos de casos agudos o durante la inspección en los centros de abasto de los casos crónicos.
- 3) Aislamiento y tipificación del *Actinobacillus pleuropneumoniae* de los pulmones de los cerdos con problemas agudos o bien crónicos.
- 4) Diagnóstico serológico que se lleva a cabo en los cerdos vivos de las granjas.

El primer método no es confiable ya que solo los signos clínicos se presentan en cursos agudos de la enfermedad, mientras que en casos crónicos pasa inadvertida (6). Para el estudio patológico se requiere de los servicios de un médico veterinario especialista en patología (6).

El aislamiento y la tipificación del microorganismo tarda de 48 a 72 horas, además de que para hacerlo es necesario contar con un laboratorio de bacteriología y de personal calificado (21, 24).

El método serológico es el más adecuado ya que se puede realizar en los animales vivos con o sin signos clínicos, no requiere del sacrificio de los cerdos y es el más rápido. Este método se basa en la detección de anticuerpos en los cerdos con el fin de determinar el "status immune" de la granja y diferenciar aquellos cerdos que fueron vacunados de los infectados (6).

Para el diagnóstico serológico de la PCP se cuenta con las siguientes pruebas:

- a) Aglutinación.- Aglutinación con partículas de látex, aglutinación en tubo con 2-metanol, hemoaglutinación indirecta (22,34).
- b) Fijación de complemento (38).
- c) Prueba de ELISA (43).
- d) Prueba de precipitación (27)



En algunos países, el diagnóstico de la PCP se lleva o se llevó a cabo mediante los cuatro métodos. Para establecer las medidas de control y erradicación de la enfermedad utilizan el diagnóstico serológico (60).

### 1.13.3. PRUEBAS SEROLÓGICAS

En general las pruebas serológicas no son de gran utilidad cuando se presentan los brotes agudos por *Actinobacillus pleuropneumoniae* pero son de gran ayuda para los estudios epizootiológicos. Los títulos de anticuerpos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* disminuyen rápidamente, de tal manera que títulos positivos indican una infección actual o una reciente. La severidad de las lesiones y la prevalencia de las lesiones crónicas puede influenciar la persistencia de los anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* (36, 52, 60).

#### 1.13.3.1 PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO (FC)

La prueba de fijación del complemento es la prueba más empleada para el diagnóstico serológico de las infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae* detectando en esta prueba los anticuerpos del tipo IgG, ya que los anticuerpos del tipo IgM son inactivados previamente por el calentamiento a 60°C. Los sueros de los animales que presentan un porcentaje de hemólisis mayor al 30% se considerarán negativos y los que tengan una hemólisis menor al 30% se consideran positivos a la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (31).

Esta prueba presenta algunos problemas técnicos como son: no diferencia a los animales vacunados de los que presentan la infección y se pueden presentar falsos positivos o negativos por la actividad anticomplementaria o procomplementaria que posee el suero del cerdo. Es una prueba demasiado complicada que ocupa muchos controles, además de que el suero no debe estar hemolizado y por lo tanto la toma de muestra sanguínea del cerdo deberá ser adecuada (38).

### **1.13.3.2 PRUEBA DE ENZIMA LIGADA A INMUNOABSORBENTE (ELISA).**

Para esta prueba se han desarrollado varias técnicas de obtención del antígeno que se emplea para la prueba pero por ninguna de ellas se han podido eliminar las reacciones cruzadas que se presentan entre los serotipos presentes en *Actinobacillus pleuropneumoniae* ni con *Actinobacillus suis*. Esta prueba detecta anticuerpos de la clase IgG por medio del anticuerpo anti-IgG marcado con una enzima la cuál generalmente es fosfatasa alcalina o peroxidasa. La interpretación se realiza marcando un valor de "corte" de densidad óptica siendo este valor el límite de diferenciación entre los animales infectados y los animales sospechosos (43,69).

### **1.13.3.4. PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN**

Las pruebas de aglutinación han sido de las más empleadas para la serotipificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La interpretación de estas pruebas se realiza de la siguiente manera (22):

- a) Son positivos los sueros de los animales que presentan cualquier grado de aglutinación y
- b) Son negativos aquellos que no muestren aglutinación.

### **1.13.3.5. AGLUTINACIÓN EN TUBO**

Detecta la presencia de anticuerpos de la clase IgM e IgG. Para esta prueba se realizan diluciones desde 1:10 hasta 1:640. La interpretación de esta prueba puede ser graduada empleando cruces, dependiendo del tamaño de las partículas que se formen, de + a 4+. El título se determina como la máxima dilución del suero que da una reacción de 2+. Los sueros que tienen un título de 1:10 o mayor son considerados positivos (34).

### **1.13.3.6. PRUEBA DE LA NEUTRALIZACIÓN DE LA HEMOLISINA**

Se ha descrito una prueba de neutralización de la hemolisina, usando sobrenadante de *Actinobacillus pleuropneumoniae* como fuente de hemolisina. Esta prueba ha mostrado varias ventajas sobre las pruebas convencionales como serían: no

son serotipo específicas, permiten diferenciar entre los animales vacunados y los no vacunados y tiene buena sensibilidad (69).

#### **1.13.4. SITUACION DEL DIAGNÓSTICO DE LA PCP EN MÉXICO.**

En México, a partir del primer aislamiento del agente responsable de la PCP en 1978 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), se ha reportado que en los cerdos que llegan a losos rastros, el 2.7% de los pulmones observados presentan lesiones pleuroneumónicas producidas *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, este serotipo es altamente patógeno y es predominante en el país. El diagnóstico de la PCP en México, se limita solo a eso al diagnóstico y no a la evaluación del “*status immune*” de la granja y le prevención de la enfermedad (6).

En México para la identificación de la PCP se emplea el diagnóstico clínico, el patológico y el bacteriológico. El diagnóstico serológico que es útil para el control y la erradicación de la enfermedad no se lleva a cabo, debido principalmente a la falta de costosa infraestructura como son laboratorios equipados y recursos humanos capacitados (6).

#### **1.13.5. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN PLACA DENOMINADA “PLEUROTTEST”**

PLEUROTTEST es una prueba de aglutinación en placa diseñada para la identificación directa de los anticuerpos capsulares de *Actinobacillus pleuropneumoniae* contenidos en el suero del cerdo de cualquier edad, mediante un simple ensayo de aglutinación en placa que se realiza en unos minutos. La utilización de éstos equipos brinda la oportunidad de conocer el “*status immune*” de la granja respecto a la enfermedad en un momento y permite establecer las medidas de control necesarias. El equipo de diagnóstico fue denominado PLEUROTTEST. Ciprián y cols., (6, 9, 66).

### 1.13.5.1. EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los cerdos cuando se infectan con *Actinobacillus pleuropneumoniae* desarrollan la PCP, estos mueren o llegan a recuperarse. En los pulmones de los cerdos que llegan a sobrevivir perduran las lesiones crónicas o “secuestro” que permanecen durante toda la vida del animal y se consideran a éstos como portadores asintomáticos. Si un cerdo sufre de la PCP y es un portador asintomático produce anticuerpos propios de la enfermedad. Por el contrario, si un cerdo es vacunado contra la PCP y no ha estado en contacto con *Actinobacillus pleuropneumoniae* desarrolla una clase de anticuerpos propios de la vacunación.

PLEUROTTEST está diseñado para diagnóstico *in vitro*, ofrece la única oportunidad de distinguir directamente en las granjas porcinas, si un cerdo ha sido infectado con *Actinobacillus pleuropneumoniae* de campo y por lo tanto es portador de la PCP o si el cerdo está sano, esté o no vacunado contra la PCP, además no se requiere de personal calificado para la interpretación de los resultados.

### 1.13.5.2. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba de PLEUROTTEST se basa en el principio de aglutinación directa. El suero de cerdo a evaluar es mezclado con el reactivo que contiene células completas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* teñido.

En el caso de un cerdo infectado por la PCP el suero contiene anticuerpos específicos que reaccionan con los antígenos presentes en el reactivo, produciendo una aglutinación caracterizada por la aparición de grumos en la mezcla, indicando un resultado positivo.

En un cerdo sano el suero normalmente no contiene anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*, si se tratara de un cerdo vacunado contra la PCP el suero contiene anticuerpos específicos contra el inmunógeno que no reaccionan con el antígeno empleado contra la elaboración del PLEUROTTEST, de tal forma que la aglutinación no se produce y no se observan grumos indicando resultado negativo.

La prueba de PLEUROTTEST se efectúa en un máximo de 10 minutos y podrá ser realizada por personal sin conocimientos técnicos.

### 1.13.6. SELECCIÓN DE LA MEJOR PRUEBA DIAGNOSTICA.

Dentro de las principales enfermedades infecciosas que afectan a los cerdos, las afecciones respiratorias son las que causan mayor impacto y mayor dificultad para controlarlas y/o erradicarlas, a continuación se describe las características de *Actinobacillus pleuropneumoniae*:

Microorganismo	Edad inicial De detección	Duración de la Inmunidad materna cadavérica (sí/no: la humanidad es protectora)	Edad cuando los signos clínicos son observados	Periodo de incubación	Reservorios	Forma de transmisión
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> Biovariedad 1. NAD dependiente	< 11 días	Con ELISA: 28 a 30 días Con neutralización de hemolisina/ F.C.: 20 a 21 días Con aglutinación: 20 a 26 días. (Si: probablemente no contra todos los serotipos)	Todas las edades en general: crecimiento/ finalización	Horas variable	Moscas Pájaros Roedores	Acrosoles Contacto directo

Modificado Amass, 1998 (1)

Las pruebas serológicas y microbiológicas por lo tanto deben de poseer una buena sensibilidad y especificidad, ya que en las granjas no se observa ningún problema que pueda hacer pensar que la PCP o la neumonía enzoótica, o la pasteurelosis pulmonar o enfermedad de Glasser esten presentes. La serología por ejemplo debería de utilizarse por lo tanto, entre otras, en las siguientes situaciones:

Confirmación de una infección crónica, previa evaluación de las lesiones pulmonares típicas.

Estudio de la cinética de anticuerpos en una granja infectada, para establecer programas de vacunación y/o medicación por vía oral (alimento/agua).

Identificación de maternidades infectadas en el caso de la compra de lechones para sistemas de tipo todo dentro, todo afuera. Este punto es importante, para la decisión de muestrear madres, se debe tener en cuenta que hay baja prevalencia, con títulos de anticuerpos bajos y por lo tanto se dificulta la interpretación (aquí la PCP deberá tratarse como una enfermedad de tipo

individual, y muestrear a todas las marranas). En el caso de los lechones se deberán de muestrear antes y después del destete a partir de las 8 semanas de edad, dependiendo del sistema de producción.

Verificación de la respuesta de anticuerpos frente a una vacunación (se deberá de tomar en cuenta que tipo de inmunógeno se esta aplicando para interpretar los resultados serológicos con los diversos antígenos).

#### Estudios serológicos tendientes a un programa de erradicación

Existen numerosos criterios que determinan cual es la mejor prueba de diagnóstico para una situación dada e incluyen: costo, sensibilidad, especificidad, rapidez y disponibilidad, todos esos criterios pueden ser correlacionados a la situación específica (72).

Los laboratorios dedicados al servicio de la industria porcina, que cuentan con una buena infraestructura diagnóstica, como son los laboratorios de diagnóstico de los Estados Unidos (72) y probablemente algunos de Salud Animal de México (70) están enfocados básicamente entre otros, a estos objetivos:

- a) A identificar la causa precisa del brote agudo de la enfermedad (desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la elaboración de seroperfiles), lo cual permite precisar los métodos de control, para ser rápidamente implementados; permite coleccionar datos de la enfermedad, para establecer las estrategias de los cambios de manejo, que permitirán prevenir el mismo problema, en el siguiente ciclo de producción
- b) A identificar y eliminar a los animales expuestos conocidos (aplicando la serología ampliamente) para erradicar ciertas enfermedades reguladas por el Gobierno Federal (como es el caso de la Brucelosis)

Las reglas de “oro” para el Dr. Zeman (72) y que muchos patólogos y microbiólogos compartimos para el diagnóstico de una enfermedad clínica es:

- 1º. Identificar las lesiones patológicas que expliquen la aparición de los signos clínicos.
- 2º. Identificar los patógenos o factores (traumas, toxinas, medio ambiente entre otros) que son conocidos y que están produciendo estas lesiones.

La identificación en ambos casos es crítica, ya que actúan en forma sinérgica para producir un diagnóstico definitivo. La investigación de las enfermedades infecciosas, con solo la observación de las lesiones sin el soporte microbiológico, restringe considerablemente las posibilidades del diagnóstico, así un diagnóstico definitivo por solo las lesiones no puede ser posible.

EJEMPLO: Meningitis purulenta en cerdos de 2 semanas de edad: Meningitis bacteriana. Para el diagnóstico definitivo es necesario realizar cultivos para identificar a: *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Escherichia coli* y otros patógenos. Si fuera al contrario, la identificación de estos agentes (aún aplicando las técnicas de PCR) y que no correspondieran a las lesiones patológicas encontradas, es solo la identificación de potenciales patógenos que son ubicuos en la pira y en las instalaciones (72).

Si la razón de la prueba de diagnóstico es algo (herramienta diagnóstica) para el diagnóstico clínico, muchas veces es muy importante clarificar la meta precisa de la prueba. Si se desea determinar el ambiente limpio de una enfermedad dada, varios factores deben ser considerados en la prueba diagnóstica, como serían: sensibilidad, especificidad, nivel de prevalencia esperada y nivel de confianza satisfactoria.

- a) Sensibilidad: Es la habilidad de una prueba para detectar a todos los verdaderos positivos.
- b) Especificidad: es la habilidad de una prueba para detectar solo a los verdaderos negativos.

Si la prueba es 100% sensible no presentaría falsos positivos (no falla para detectar a los verdaderos positivos); si la prueba es 100% específica no presentaría falsos negativos (no falla para detectar a los verdaderos negativos). Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad van de la mano, es decir cuando se afecta una también la otra. El efecto esperado es cuando aumenta la sensibilidad, puede disminuir la especificidad o bien cuando aumenta la especificidad, puede disminuir la sensibilidad. Si fuera 100% sensible y 100% específica se estaría frente a una prueba perfecta. Desafortunadamente existen pocas pruebas perfectas en el mundo, y se tiene que determinar un cierto nivel de aceptabilidad, como ocurre con el PCR (72).

El nivel de aceptabilidad esta relacionado a la pregunta específica que se intenta responder. Si la decisión a tomar es la erradicación de una enfermedad dada, la Normas Oficiales indican que la prueba debe de tener una alta sensibilidad, para identificar a los infectados en forma individual. La prueba mas sensible sería preferida, si la especificidad estuviera insignificamente comprometida, ya que durante la erradicación un falso positivo raro (verdaderamente negativo) sería mejor para el proceso del mismo, que un falso negativo raro (verdaderamente positivo), ya que estos animales falsos negativos estarían diseminando la enfermedad en la demás población, y afectaría seriamente el proceso de erradicación (72).

En general, la sensibilidad de una prueba es de suma importancia, cuando los animales probados resultaron positivos fueron los que produjeron la enfermedad en la pira sana y limpia, y fueron los que causaron el brote. Así. la especificidad se convierte de suma importancia, cuando hay interés que un falso positivo no ponga fin a la utilidad de un animal valioso (55).

El costo de las pruebas de laboratorio en medicina veterinaria (sobre todo en la porcicultura) es siempre un problema, en algunas ocasiones el costo de 10.00 dólares por prueba, puede ser útil, sin embargo, el costo de 25.00 dólares por prueba, afectaría seriamente la economía de la producción animal. En otras ocasiones el costo de 50.00 dólares por prueba, puede ser de gran utilidad por la prevención de pérdidas económicas.



Ahí es donde se tiene que tener muy claro, que pregunta específica se quiere contestar con la prueba a utilizar y que a la vez sea económica. La popularidad de la prueba afecta también el precio, una demanda de la prueba hace que el laboratorio, adquiera los reactivos necesarios para llevarla a cabo y la hace menos cara. De ahí, que los laboratorios estén considerando el costo de las nuevas pruebas y las estén comparando con el costo de las “viejas” pruebas, y a la vez estén analizando las ventajas y desventajas de las mismas (70, 72).

#### 1.13.3.7. La prueba 2-ME-TA y ELISA

Han sido propuestas como pruebas serológicas para *Actinobacillus pleuropneumoniae* y son prometedoras para uso de rutina. Ambas pruebas 2-ME-TA o ELISA son altamente específicas y más sensibles que la prueba de FC. La prueba de ELISA es fácilmente automatizable, además de ser económica y requiere menos tiempo que la prueba FC. Una desventaja de estas pruebas, es que presentan reacciones cruzadas entre serotipos, pero esto no interfiere con su utilidad como prueba rápida de tamiz. Una mayor sensibilidad se puede obtener por el empleo de los antígenos de cepas poliespecíficas para propósitos de tamizar y determinar la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en una piara. Si se obtienen resultados positivos con el antígeno poliespecífico, se pueden emplear antígenos mono-específicos para serotipificar (43).

La prueba de BAHIA (Blood Agar Hemolysin Inhibition Assay) se basa en la neutralización de las toxinas que produce *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el medio de cultivo sólido con sangre y con suero de animales convalescientes o crónicos, que solo tendrán anticuerpos anticitolisinas, porque están infectados, así mismo, si la toxina excretada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* produce hemólisis en el agar sangre en presencia de suero de un cerdo, esto se interpreta como un animal sano. (69).

## **2.0. OBJETIVO GENERAL**

Comparar dos técnicas para determinar la presencia de anticuerpos y realizar un perfil serológico en granjas con problemas de pleuroneumonía contagiosa porcina y determinar el status inmune en los cerdos.

## **2.1. OBJETIVOS PARTICULARES.**

2.1.1. Determinar anticuerpos por la prueba de Pleurotest.

2.1.2. Determinar anticuerpos por la prueba de inhibición de la hemolisina.

2.1.3. Obtener el perfil serológico de anticuerpos de cerdos infectados versus anticuerpos de cerdos vacunados de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ApXI) usando la prueba de inhibición de la hemolisina en un soporte líquido.

## **2.2. HIPÓTESIS:**

Que la prueba de la inhibición de la hemolisina es capaz de detectar sueros positivos a la enfermedad de la pleuroneumonía contagiosa porcina.

### 3.0 MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Granjas:

Dos granjas fueron seleccionadas para este estudio, la granja "A" localizada en el estado de Michoacán, tenía animales vacunados (los cerdos fueron vacunados dos veces por vía intramuscular; la primera dosis fue dada a las seis semanas de edad y la segunda dosis a las catorce semanas de edad), a continuación se describe el calendario de actividades:

GRANJA "A". Granja localizada en Michoacán, en donde se muestrearán 55 animales, durante las 16 semanas de edad y que fueron previamente identificados con aretes.

NÚMERO DE MUESTREO	1°.	2°.	3°.	4°.	TOTAL
EDAD	6 SEMANAS	8 SEMANAS	14 SEMANAS	16 SEMANAS	
GRUPO CONTROL SIN VACUNAR	11	11	11	11	44
GRUPO VACUNADO POR VIA IM	44	44	44	44	176
TOTAL	55	55	55	55	220

La otra granja "B" localizada en el estado de Jalisco que también tenía animales vacunados (los cerdos fueron vacunados dos veces una a las seis semanas y otra a las 11 semanas de edad, por vía intramuscular y por vía subcutánea respectivamente), a continuación se describe el calendario de actividades:

GRANJA "B". Granja localizada en Jalisco, en donde se muestrearán 51 animales, durante las 13 semanas de edad y que fueron previamente identificados con aretes.

NUMERO DE MUESTREO	1°.	2°.	3°.	4°.	TOTAL
EDAD	6 SEMANAS	8 SEMANAS	11 SEMANAS	13 SEMANAS	4
GRUPO CONTROL SIN VACUNAR	11	11	11	11	44
GRUPO VACUNADO POR VIA IM	30	30	30	30	120
GRUPO VACUNADO POR VIA SC	10	10	10	10	40
TOTAL	51	51	51	51	204

### 3.2 Vacuna.

Las dos granjas fueron vacunadas con una vacuna subunitaria comercial, compuesta de una proteína de membrana externa (OMP: Outer Membrane Protein) y de un toxoide a base de ApXI (PM de 105 d); de ApXII (PM de 103 d) y ApXIII (PM de 120 d) en adyuvante acuoso. Los cerdos se vacunaron a la dosis de 2.0 ml/animal por vía intramuscular (IM) ó por vía subcutánea (SC).

### 3.3 Muestreo.

De la Granja A: se identificaron 44 cerdos y fueron muestreados cuatro veces a intervalos del primer sangrado hasta el final de 2, 6 y 2 semanas, identificados como grupo intramuscular (GI), mientras que otros 11 cerdos conformaron el grupo control sin vacunar (GC) y fueron muestreados al igual que el grupo GI.

De la Granja "B" se identificaron 30 cerdos vacunados por vía intramuscular y se muestrearon 4 veces a intervalos del primer sangrado hasta el final de 2, 3, y 2 semanas, haciendo un total de 120 sueros y se conformó el grupo intramuscular (GI); así mismo, se identificaron otros 10 cerdos y se muestrearon 4 veces, en los mismos intervalos, haciendo un total de 40 sueros y se conformó el grupo vacunado por vía subcutánea (GSC), finalmente se seleccionaron 11 cerdos que también fueron muestreados cuatro veces haciendo un total de 44 sueros y se conformó el grupo control sin vacunar (GC).

El muestreo se realizó a diferentes edades, considerándose el sangrado basal en la semana seis para la determinación de anticuerpos inhibidores de la hemólisis y anticápsula. Para la granja "A" los sangrados fueron 6, 8, 14 y 16 semanas de edad, los cuatro sangrados fueron de un total de 220 sueros. De la granja "B" los animales fueron sangrados a las 6, 8, 11 y 13 semanas de edad, los cuatro sangrados en esta granja fueron de 204 sueros en total.

#### **3.4. Cultivo:**

Se preparó un cultivo de 6 horas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 ApXI utilizando un medio líquido de RPMI.1640 (sigma Chemical), se le adicionó NAD al 10% (v/v), además se le adicionó  $\text{CaCl}_2$  y se incubó durante 6 y 7 horas a 37 °C. El sobrenadante se obtuvo por centrifugación, se almacenó una parte a -70 °C, y se le determinó la presencia de hemolisina, a la otra parte se le adicionó un inhibidor de proteasa (20 ug/ml) denominado leucopeptin (Sigma Chemical) (67). Durante la incubación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, se le determinó la producción de la hemolisina cada hora, hasta obtener un título máximo a las 6 horas.

#### **3.5. Purificación de la hemolisina:**

Se concentró y purificó parcialmente por medio de una membrana de exclusión de peso molecular de corte a 100,000 trabajándose con la fracción retenida en la cual se encontraba la hemolisina ApXI. El fluido retenido fue alicuotado y congelado a -70 °C y también se adicionó un inhibidor de proteasas (leupeptin) y se guardó hasta el momento de su empleo en pruebas serológicas.

### 3.6. Prueba de la inhibición de la hemolisina:

A las muestras se les determinaron los títulos de anticuerpos contra la citolisina ApXI por la prueba de inhibición de la hemolisina (IHem). El desarrollo de la prueba de IH se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Udeze y Kadis (67) que consistió en preparar eritrocitos de bovino, estos se obtuvieron en la solución de Alsevers, se dejaron reposar 24 horas. Y se lavaron con una solución amortiguadora a pH=7.8 y se estandarizó al 1% en 500  $\mu$ l de una solución de NaCl 0.15 M, para realizar diluciones dobles de las muestras en una solución salina de calcio tris-amortiguado (TBCS) (20 mM tris-HCl, 5mM CaCl<sub>2</sub> y 150 mM NaCl; pH 7.8).

Después de un periodo de incubación a 37 °C , los tubos fueron centrifugados (8,000 x g, 1 minuto) y los sobrenadantes fueron medidos a una longitud de onda de  $\lambda$  545 nm. Una unidad hemolítica (HU) fue definida como la cantidad de hemolisina activa presente en la dilución que resultó con una lisis de los eritrocitos del 50 %. La absorbancia de referencia de valor para 50% de lisis fue determinada por la lisis de los eritrocitos contenidos en 0.25 ml de la suspensión con un ml de agua. La dilución correspondiente a 50% de lisis fue determinada por la fórmula del doble punto de interpolación. El título un UH por mililitro fue expresado como el recíproco de la dilución que correspondió al 50% de lisis, multiplicado por dos.

### 3.7. Prueba de Aglutinación

Todos los sueros de las granjas "A" y de la granja "B" fueron probados con el reactivo de la prueba "PLEUROTTEST", para diagnosticar los serotipos 1,3,5,7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

La prueba con PLEUROTTEST se efectúa en un máximo de 10 minutos. El frasco con el reactivo se deja a temperatura ambiente, durante 10-15 minutos. Utilizando la pipeta se coloca una gota de suero problema en una de las celdas de la placa. Se coloca una gota del reactivo se mezcla con el suero problema con el palillo mezclador y la presencia de aglutinación da la prueba positiva.

#### 4. RESULTADOS

El título máximo encontrado en el cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 fue a las 6 horas de incubación, en donde a la dilución de 1:2 tuvo una absorbancia de 0.498 y un 62.7 % de hemólisis, seguida de la dilución 1:4 que tuvo una absorbancia de 0.455 y un 56.6 % de hemólisis. Con esta dilución se realizaron las pruebas de inhibición de la hemolisina con los 424 sueros muestreados.

##### Granja A (Michoacán)

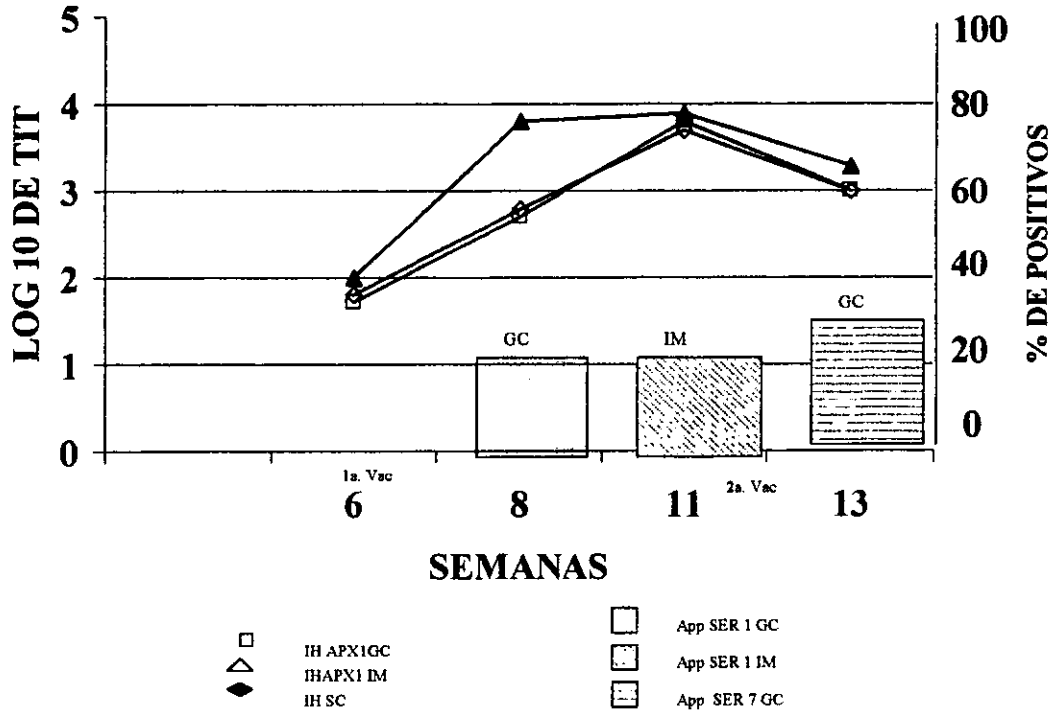
Los sueros de los cerdos del grupo control (GC) mostraron al inicio títulos en promedio de  $10^{2.3}$  de IHem, que se elevaron a  $10^{2.5}$  a la semana 8 y  $10^3$  a la semana 14 y decrecieron a  $10^{2.8}$ , en el caso de los cerdos vacunados por vía intramuscular (GI), el comportamiento a los 6 y 8 semanas fue del  $10^{2.3}$  y se elevó a  $10^{3.0}$  en la semana 14 y decreció a  $10^{2.8}$  en la semana 16. En relación a la prueba de aglutinación en placa (PAP), en la semana 6 se detectaron reactivos positivos a *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1 y 5 en ambos grupos, y solo en la semana 16 se detectó el serotipo 1 en los cerdos vacunados (Figura 1).

##### Resultados de las pruebas de Aglutinación (PAP) y de la Inhibición de la Hemólisis (IHem).

NUMERO DE MUESTREO	1°.		2°.		3°.		4°.	
	6 SEMANAS		8 SEMANAS		14 SEMANAS		16 SEMANAS	
TECNICA	(PAP)	Tit	(PAP)	Tit	(PAP)	Tit	(PAP)	Tit
	% (Ser)	IHem	% (Ser)	IHem	% (Ser)	IHem	% (Ser)	IHem
GRUPO CONTROL SIN VACUNAR	10 (1) 14 (5)	$10^{2.3}$	0	$10^{2.5}$	0	$10^{3.0}$	40 (1)	$10^{2.8}$
GRUPO VACUNADO POR VIA IM	10 (1) 14 (5)	$10^{2.3}$	0	$10^{2.3}$	0	$10^3$	0	$10^{2.8}$

##### Granja B (Jalisco)

**Figura No2. Inhibición de la Hemolisina (IHem) y Aglutinación en Placa (PAP) Granja Jalisco vacunación a las 6 y 11 semanas**





### Granja B (Jalisco)

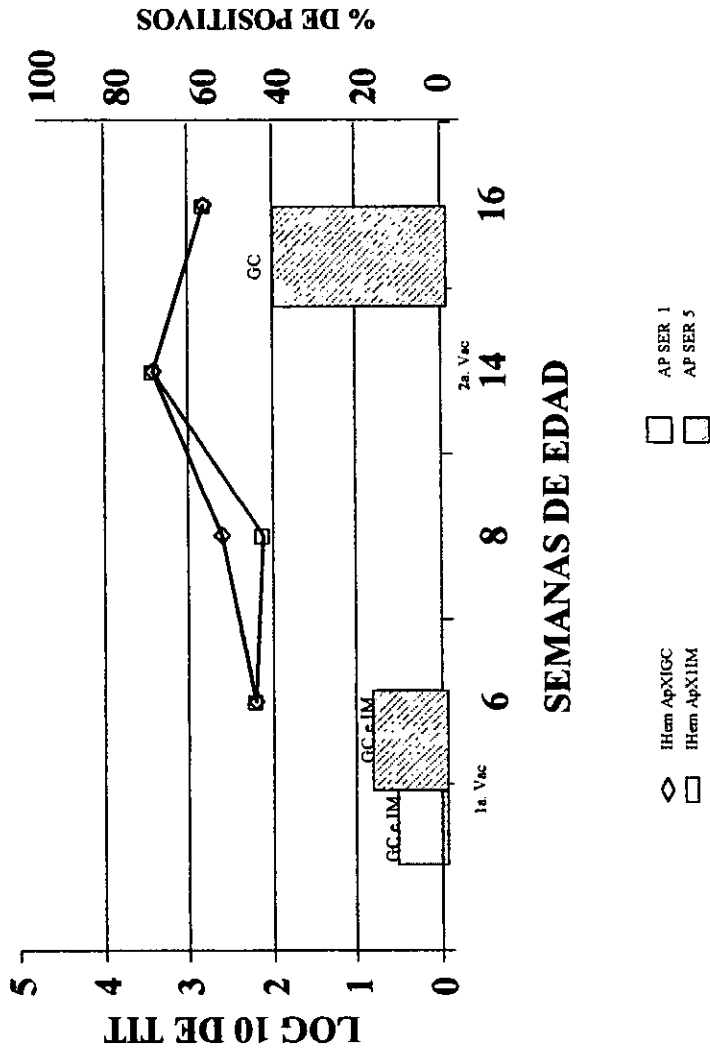
En los sueros de los animales del grupo control sin vacunar mostraron títulos iniciales de  $10^{2.0}$  IH al inicio del estudio y se elevaron a  $10^{3.6}$  a las 8 semanas hasta llegar a  $10^4$  en la semana 11 para el siguiente muestreo bajo a  $10^{3.2}$ . El comportamiento de la serología en los cerdos vacunados por vía subcutánea (GSC) e intramuscular (GI) mostró el mismo patrón en un promedio de títulos en donde en la semana 6 tuvieron  $10^2$ ; semana 8,  $10^{2.8}$ ; semana 11,  $10^{4.0}$  y semana 13,  $10^3$ . En relación con la prueba de aglutinación en placa (PAP) sólo se detectaron a la semana 11, el serotipo 1 en los cerdos del grupo control y en los vacunados por vía intramuscular (GI) y sólo en la semana 13, se encontraron reactores positivos al serotipo 7 en los cerdos controles (Figura 2).

Resultados de las pruebas de Aglutinación en placa (PAP) y de la Inhibición de la Hemólisis (IHem).

NUMERO DE MUESTREO	1°.		2°.		3°.		4°.	
	6 SEMANAS		8 SEMANAS		11 SEMANAS		13 SEMANAS	
TECNICA	(PAP)	Tit	(PAP)	Tit	(PAP)	Tit	(PAP)	Tit
	% (Ser)	IHem	% (Ser)	IHem	% (Ser)	IHem	% (Ser)	IHem
GRUPO CONTROL SIN VACUNAR	0	$10^{2.0}$	0	$10^{3.6}$	20 (1)	$10^{4.0}$	25 (7)	$10^{3.2}$
GRUPO VACUNADO POR VIA IM	0	$10^{2.0}$	0	$10^{2.3}$	20 (1)	$10^{4.0}$	0	$10^{3.0}$
GRUPO VACUNADO POR VIA SC	0	$10^{2.0}$	0	$10^{2.3}$	0	$10^{4.0}$	0	$10^{3.0}$

# Figura No.1 Inhibición de la Hemolisina (IHem) y Aglutinación en Placa (PAP)

## Granja Michoacán vacunación a las 6 y 14 semanas



## 5. DISCUSIÓN

Las pruebas de diagnóstico serológico se llevan a cabo en los cerdos vivos presentes en las granjas o en los cerdos en los centros de abasto. El método serológico es uno de los mas adecuados, ya que se puede realizar en los animales vivos con y sin signos clínicos, no requiere del sacrificio de los cerdos, es mas rápido y nos permite hacer perfiles de la enfermedad, identificando el punto de infección en la granja, además permite identificar los serotipos prevalentes, como sucede con *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Para el diagnóstico serológico de la PCP, se encuentran algunas pruebas tales como; aglutinación, aglutinación con partículas de látex, aglutinación lenta en tubo; aglutinación lenta en tubo con 2-mercaptoetanol, hemoaglutinación indirecta, fijación de complemento, todas ellas a base del cuerpo bacteriano de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y las pruebas de ELISA a base de proteínas de membrana externa, ó de LPS y recientemente de cápsula; entre otras. Pocas de estas pruebas se realizan en México, y las que se utilizan son mas para estudios de investigación que para diagnóstico, debido principalmente a la falta de infraestructura, equipo, y personal capacitado, que solo los laboratorios de las Universidades e Institutos cuentan (5).

Recientemente se ha diagnosticado la PCP por la presencia de anticuerpos por lo menos contra una de las tres citolisinas ApXI, ApXII y ApXIII en el suero de animales infectados (69). Basándose en este mismo principio, se preparó una prueba de inhibición de la hemólisis (IHem) utilizando la toxina ApXI de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, que no detecta solo la del serotipo 1 sino que también existen otros serotipos que la excretan como son los serotipos 5, 9 10 y 11. De tal manera que la prueba experimentada en este trabajo solo contestaría la pregunta que animales están infectados o no infectados, así mismo no identificaría el serotipo o los serotipos prevalentes en una misma granja, como lo hacen las pruebas de aglutinación. Así mismo, esta prueba realizada en soporte líquido fue fácil de llevar a cabo y menos laboriosa y detecto anticuerpos de infección (4).

Los sueros probados en la granja "A", los títulos encontrados fueron para la semana 6, y para la semana 8 prácticamente los mismos, para la semana 14 se elevaron; en la 16 los títulos decrecieron, en forma muy parecida. Los sueros probados en la granja "B", los animales del grupo control, vacunados por vía intramuscular y por vía

subcutánea, presentaron el mismo título a la semana 6; y a la semana 8 incrementaron para los cerdos vacunados por vía subcutánea; grupo control y vacunados por vía intramuscular respectivamente; para la semana 11, los tres grupos presentaron un mismo y elevado título y para la semana 13 decrecieron para los cerdos vacunados por vía subcutánea; el grupo vacunado por vía intramuscular en la primera vacunación aparentemente elevó los títulos, sin embargo la segunda vacunación al parecer los disminuyó, probablemente por la misma neutralización del toxoide presente en la vacuna.

La prueba de aglutinación PLEUROTTEST identificó a los serotipos prevalentes en las dos granjas en el periodo de las 8 a las 13 ó 16 semanas, lo que confirman que la prueba solo identifica anticuerpos de infección de tipo capsular. Con la prueba de aglutinación PLEUROTTEST se detectaron anticuerpos anticápsula, de tipo crónico, ya que los anticuerpos en la granja "A" y "B" desde la semana 11 hasta la 16 fueron propios de una infección y no producto de una vacunación. En los cerdos de la granja "A", vacunados por vía intramuscular a las semanas 6 y 14 solo se pudieron detectar anticuerpos con PLEUROTTEST hasta la semana 14; mientras que en los cerdos vacunados subcutáneamente a la semana 6 y 11 solo se detectaron anticuerpos anticápsula a la semana 8 y 11, lo que determina posiblemente que los cerdos tienen un secuestro pulmonar (4, 7).

La prueba de IHem al parecer interfiere con los anticuerpos generados de la vacuna subunitaria comercial, compuesta de una proteína de membrana externa (OMP: Outer Membrane Protein) y de un toxoide a base de ApXI (PM de 105 d); de ApXII (PM de 103 d) y ApXIII (PM de 120 d) en adyuvante acuoso. Sin embargo, los datos encontrados con la prueba de neutralización de la hemolisina ApXI, mostraron que los anticuerpos vacunales no interfirieron con producidos por una infección (Fenwick 2000, comunicación personal).

La prueba IHem no diferenció anticuerpos producidos por la vacunación, de aquellos producidos por una infección. Las dos granjas fueron vacunadas con un toxoide a base de una proteína de membrana externa y citolicinas ApXI, ApXII y ApXIII; en la granja "A" se vacunó a la semana 6 y se vacuno a la semana 11, mientras que en la granja "B" se vacunaron dos grupos uno por vía intramuscular y otro por vía

subcutánea en la semana 6 y se revacunaron en la semana 11, por lo tanto la presencia de anticuerpos anticitolisina ApXI deberían ser producto de la vacunación, sin embargo, si se comparan los resultados de los controles de las dos granjas, los cuales no fueron vacunados, se observa que presentan los mismos títulos, lo que sugiere que los animales, ya estaban infectados y la vacuna no estimuló la producción de inmunoglobulinas o la vacuna no protegió.

La prueba de BAHIA se basa en la neutralización de las toxinas que produce *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, en el medio de cultivo sólido con sangre y con suero de animales convalescientes o crónicos, que solo tendrán anticuerpos anticitolisinas, porque están infectados, así mismo, si la toxina excretada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* produce hemólisis en el agar sangre en presencia de suero de un cerdo, esto se interpreta como un animal sano ó no vacunado con inmunógenos a base de toxoides (69).

La prueba de inhibición de la hemólisis (IHem) establecida en este trabajo, en donde la ApXI esta presente en la fase líquida, permitió hacer diluciones del suero sospechoso y encontrar los títulos de anticuerpos contra la citolisina y se determinó así una dinámica de anticuerpos producida por una infección con *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 o bien por una posvacunación con estas toxinas en forma de toxoides que la industria farmacéutica veterinaria utiliza en forma rutinaria.

La dinámica serológica con la prueba de IHem encontrada en los sueros de los mismos animales del grupo control de la granja A, mostró que desde un inicio se estaban incrementando los títulos serológicos, mientras que con la prueba de aglutinación en placa PLEUROTTEST se detectaron los serotipos 1 y 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en menos del 10% de los animales, este perfil indicó claramente que los anticuerpos contra los serotipos 1 y 5 eran de origen materno y aunque en la semana 8 que fueron vacunados, los cerdos apenas estaban infectándose con estos serotipos prevaecientes en la granja "A". Sin embargo, solo fue identificado en mas del 40% de los animales probados en la semana 16, mientras que los títulos de IHem empezaron a declinar. El grupo de cerdos vacunados se observó claramente que en la primera vacunación se elevaron los títulos IHem, así como la presencia de anticuerpos anticapsula de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1 y 5. Sin embargo, con la

segunda vacunación no se observó la respuesta secundaria clásica, y los títulos encontrados fueron declinando, es probable que sea por la misma neutralización por parte del toxoide presente en la vacuna, y solo se detectaron anticuerpos contra el serotipo 5 en la semana 14 y no contra el serotipo 1, la presencia de anticuerpos contra el serotipo 5 en este periodo no indica que los animales se infectaron entre la semana 6 y 14.

La dinámica serológica con la prueba de IHem encontrada en los sueros de los mismos animales del grupo control de la granja B, mostró que desde un inicio también se estaban incrementando los títulos, aún mas en el grupo de cerdos vacunados por vía subcutánea, mientras que los grupos control y vacunados por vía intramuscular tuvieron un comportamiento similar. Con la prueba de aglutinación en placa PLEUROTTEST no se detectaron los serotipos *Actinobacillus pleuropneumoniae* en los animales que fueron vacunados tanto por vía subcutánea como por vía intramuscular en la semana 6 como en la 8. Sin embargo, solo fue identificado en menos del 10% de los animales probados en la semana 11 y 13, los serotipos 1 y 5 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, mientras que los títulos de IHem también empezaron a declinar. El grupo de cerdos vacunados se observó claramente que en la primera vacunación se elevaron los títulos IHem, así como la presencia de anticuerpos anticápsula de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1 y 5, sin embargo, con la segunda vacunación no se observó la respuesta secundaria clásica, y los títulos encontrados fueron declinando, es probable que sea por la misma neutralización por parte del toxoide presente en la vacuna.

## 6. CONCLUSIONES

1. Los títulos de anticuerpos contra la citolisina ApX I fue determinada por la prueba de inhibición de la hemolisina en soporte líquido.
2. Los sueros también reaccionaron con la prueba de aglutinación PLEUROTTEST para serotipificar al *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
3. En la granja "A" la prueba de aglutinación identificó anticuerpos maternos contra los serotipos 1 y 5 a partir de la sexta semana, mientras que solo hasta la 16ª semana los cerdos tuvieron sus propios anticuerpos y fueron detectados solo para el serotipo 1.
4. Los anticuerpos IHem para los grupos vacunados y no vacunados se observó el mismo comportamiento, para la semana 6 y para la semana 16.
5. En la granja "B" en el tiempo cero no se detectaron anticuerpos contra los serotipos incluidos en PLEUROTTEST (1, 3, 5 y 7), únicamente en la 11ª semana se detectaron los serotipos 1 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, mientras que en la 13ª semana fue detectado únicamente el serotipo 1.
6. Se detectaron los anticuerpos IHem en los cerdos vacunados subcutáneamente e intramuscularmente, en la semana 8; en todos los grupos vacunados por vía SC tuvieron el mismo título en las semanas 6, 11 y 13 y fue en forma ascendente.
7. Con la prueba de aglutinación los anticuerpos de los animales infectados comenzaron a ser detectados, cuando ya tenían daño en el pulmón.
8. Posiblemente con la prueba de IHem se detectó la infección en la semana 8 y 14 de la granja "A" y en la semana 8 y 11 en la granja "B" etapas en las que fueron vacunados con el toxoide comercial.

## 1. REFERENCIAS

1. Amass, S. ( 1988) Swine Respiratory Diseases: A review. The Effect of wean age on pathogen removal memorias del VII Día del Porcicultor 1998. Asociación de Médicos Veterinarios Zootecnistas Especialistas en ciencias Porcícolas del sur de Sonora, A.C. Navojoa, Sonora, México, pp6-20
2. Backstrom, L. & Hoefling, D.C. (1982) "Respiratory diseases of swine". Vet. Clin. N. Amer. Large Anim. Prac. P: 259-276
3. Bradreth, E.L. & Smith, I.M. (1985) "Prevalence of pig herds affected by Pleuroneumonía associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* in Eastern England" Vet. Rec. 117: 143-145.
4. Ciprián, C.A., Medina,A.G., Fuentes, R.M. Pijoan, A.C., Torres, A.O., Colmenares, V.G. Camacho, M.J.(1988) "Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México." Vet. Méx. 19: 205-210
5. Ciprián, A., Colmenares, G. Y Mendoza, S. La Enfermedad en México *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* (1990).Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Editado por AMVEC, AC. Guadalajara, Jal, México. Pp. 29-42.
6. Ciprián, C.A., Mendoza, E.S., y Garcia, M.C. (1994) "Primer Ciclo Nacional de Afecciones Respiratorias del cerdo" F.E.S.-C,U.N.A.M., U.A.Y. México. P: 128.
7. Cole, J.R. (1978) "*Haemophilus parahaemoliticus* associated with pleuropneumonia in Georgia," Vet. Med. Small Anim. Clin. 73: 1444-1446.
8. Colmenares, G., Torres, O., Lara, V., Camacho, J., Alvarez, J., de la Garza, M., Ciprián, C. (1988) "Resistencia antimicrobiana no codificada por plásmidos en *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1" Vet. Méx. 19: 315.



9. Colmenares, V., Mendoza, S., Ayala, G., y Ciprián, A. (1992). A rapid field serological test for the diagnostic of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Proceedings 12 th. International Pig Veterinary Society, 1992. The Hague, The Netherlands. P, 223.
10. Cowan, S.T., & Steel, J. (1974) "Manual para la identificación de bacterias de interés médico". 2th. De. Cambridge Univ. Press. 137-142.
11. Chan, C., Yamamoto, K., Konoshi, S., & Ogata, M. (1978) "Isolation and antigenic characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* from porcine pneumonia. Jpn.J. Vet. Sci. 40: 103-107.
12. Diaz, C., González, M., Jiménez, E., y Sthepano. A. (1988) "Identificación de diferentes serotipos de *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* aislados en México de cerdos con pleuroneumonía de 1985 a 1988." Vet. Méx. 20: 157-160.
13. Didier, P.J., Perino, L., & Urbance, J. (1984) "Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*: microbiological and pathological findings." J.A.V.M.A. 184: 715-719.
14. Fales, W.H., Morehouse, L.F., Mittal, K.R., Knudsen, C.B., Nelson, S.L., Kinter, L.D., Turk, J.R., Turk, M.A., Brown, T.P., & Shaw, D.P. (1989) "Antimicrobial susceptibility and serotypes of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* recovered from Missouri swine." J. Vet. Diagn. Invest. 1: 16-19.
15. Fenwick, B. (1990) "Diagnóstico de Pleuropneumonía Porcina en el laboratorio". Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. AMVEC. 17.
16. Fenwick, B. & Henry, S. (1994). Porcine pleuropneumonia. J.Am.Vet.Med.Assoc. 204:1334-1340.

17. Frey, J., & Nicolet, J. (1990) "Hemolysin pattern of *Actinobacillus pleuropneumoniae* J. Clin. Microbiol. 28: 232.
18. Fukuyasu, T., Sakpurn, T., Saito, K., & Ashida, K. (1991) "Serotyping and drug susceptibility of strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolated from pneumonic lungs of pigs". J. Jap. Vet. Med. Assoc. 44: 11-16.
19. Garibay, E.J., Ciprián, C.A., Mendoza, E.S., González, G.S., Hernández-Baumgarten, E. (1993) "Apéndices extracelulares en *Actinobacillus pleuropneumoniae* aislados de casos agudos de pleuroneumonía contagiosa porcina." XXVIII Congreso A.M.V.E.C. Cancún Quintana Roo. p:283.
20. Gerrlach, G.F., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A. Potter, A.A., Wilson, P.J. (1993) "Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (Oml A) From *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1". Infect. Immun. 61:565-567.
21. Gilbride, K.A., & Rosendal, S. (1983) "Evaluation of selective medium for isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae*". Canad. J. Comp. Med. 47:455-450.
22. Gunnarsson, A., Biberstein, E.L., & Hurvell, B. (1977) "Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahemolyticus (pleuropneumoniae)*: agglutination reaction." Am. J. Vet. Res. (39): 1111-1114.
23. Gunnarson, A., Hurvel, B., & Biberstein, E.L. (1977) "Serological studies of porcine strains of *Haemophilus pleuropneumoniae*: Antigenic specificity and relationship between serotypes." Am. J. Vet. Res. 39(8): 1286-1292.
24. Hoffman, L.J., Carballo, J.P., & Henderson, L.M. (1985) "Clinical, bacteriologic and serologic features of *Haemophilus pleuropneumoniae* outbreaks in Iowa swine." Am. Assn. Vet. Lab. Diagnose. 28<sup>th</sup> Ann. Proc. 211-224.

25. Hommez, J., Devriese, L.A., Cassimon, P., & Castryck, F. (1988) "Serotypes and antibiotic sensitivity of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains isolated in Belgium." *Vlaams Diergenesk. Tijdschr.* 57: 46-52.
26. Hommez, J., Devriese, L.A., Cassimon, P., & Castryck, F. (1990) "Slide precipitation a simple method of type *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*." *Vet. Microbiol.* 24: 123-126.
27. Hunter, D. et al. (1983). "Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates using ring precipitate tests." *Vet. Rec.* 113: 158.
28. Kamp, M., Popma, J.K., Anakotta, J. & Smits, M. (1991) "Identification of haemolytic and cytotoxic proteins *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies." *Infect. Immun.* 59(9): 3079-3085.
29. Kilian, M., & Mestecky, J. (1979) "Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulina A1 protease." *Infect. Immun.* 26: 143.
30. Little, T.W.A., & Harding, J.D.J. (1980) "The interaction of *Haemophilus parahemolyticus* and *Pasteurella multocida* in respiratory tract of pig. *Brit. Vet. J.* 136: 371-383.
31. Lombin, L.H., Rosendal, S.A., & Mitachel, W.R. (1982) "Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuroneumonia in swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*". *Canad. J. Comp. Med.* 46: 109-114.
32. Mac Fading, F.J. (1980) "Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica." *De. Panamericana*, Buenos Aires, Argentina.
33. Mittal, K.R., Higgins, R., & Lariviere, S. (1982) "Evaluation of slide agglutination and ring precipitation test for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*." *J.Cin. Microbiol.* 15: 1019-1023.

34. Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S., & Leblnack, A. (1984) "A 2 mercaptoethanol tube agglutination test for the diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs." Am. J. Vet. Res. 45: 715-719.
35. Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. & Nadeau, M. (1992) "Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec" Vet. Microbiol. 32: 135-148.
36. Morilla, G.A., (1994) "Los seroperfiles en la clinica porcina". Acontecer Porcino VII (9): 65-74.
37. Nakai, T., Kume, K. & Sawata, A. (1983) "Characterization of the hemolysin produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*." Am. J. Vet. Res. 44: 344-347.
38. Nakai, T., Sawata, A. & Kume, K. (1985) "Duration of the Complement-fixation antibodies in pigs and guinea pigs by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccine". Jpn. J. Vet. Sci. 47: 503-506.
39. Nakai, T. Ono, E., Ikc, K., & Kume, K. (1992) "Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by using of purified capsular polysaccharide of lipopolysaccharide." Procceding 12<sup>th</sup> Int. Pig. Vet. Soc. The Hague, the Netherlands. P: 186.
40. Negrete- Abascal, E., Tenorio, V., Garcia, C., Godines, D., Serrano, J.J., Alvarez de la Cuadra, J., y De la Garza, M. (1994) "*Actinobacillus pleuropneumoniae*: Virulence and Gene Cloning". Archives of Medical Research 25 (2): 229-233.
41. Nicolet, J. (1971) "Sur l'hemophilise du porc. III. Diferenciacion serologic *H. parahemolyticus*." Zentralb. Bakteriolog. Abt. 1 Orig. B. 216: 487-495.
42. Nicolet, J.,& School, E. (1981) "*Haemophilus* infections. Diseases of swine". 5<sup>th</sup>. De (A.D. Ieman et. al. Eds). Iowa State University Press, Ames. p 368-377.

43. Nicolet, J., Krawinkler, M., Baumgarther, A. (1981) "An enzyme linked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*." Can. Vet. Res. 42: 3129-3132.
44. Nicolet, J. (1986) "*Haemophilus* infections. Diseases of swine". 6<sup>th</sup> De. (A.D. Leman et eds.). Iowa State University Pres, Ames. p: 426-436.
45. Nielsen, R. (1974) "Serological and immunological studies of Pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus parahemoliticus*". Acta Vet. Scan. 15: 80-89.
46. Nielsen, R. (1986) "Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal a new serotype: 12." Acta Vet. Scan. 27: 453.
47. Olander H.J. (1963) "A septicemic disease of swine and its causative agent: *H. parahemoliticus*". Ph. D. thesis. University of California, Davis.
48. Pijoan, C., Ochoa, G., Méndez, D., Lastra, A. (1978) "Aislamiento de *Haemophilus parahelyticus* de cerdos con neumonia". Tec. Pec. En Méx. 34: 85-87.
49. Pijoan, C. (1982) "*Haemophilus pleuropneumoniae*". Mod. Vet. Prac. 63: 653-645.
50. Pijoan, C., Morrison, R.B. (1983) "*Haemophilus pleuropneumoniae*". Proc. Ann. Conf. Swine. Herds Health Programing.: 199-206.
51. Pijoan, C. (1984) "*Haemophilus updata*". Proc. Ann. Conf. Swine Herd Health Programming p: 111<sup>a</sup>.
52. Pijoan, C. (1985) "Serology and immunology of *Haemophilus pleuropneumoniae*". *Haemophilus pleuropneumoniae* Compendium AASP Ann. Mtg. March. p: 23-27.

53. Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiken, W., & Mannheim, W. (1983) "Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella haemolytica-organii*, causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness". *Int. J. Syst. Bact.* 33: 510-514.
54. Rosendal, S., Lombin, L., & De Moor, J. (1981) "Serotyping and detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* by indirect fluorescent antibody technique". *Can. J. Comb. Med.* 45: 271-274.
55. Rosendal, S., & MacInnes, J.T. (1981) "Vaccination against pleuropneumonia of pigs caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*". *Canad. Vet. J.* 22: 34-35.
56. Rosendal, S., & Boyd, D.A. (1982) "*H. pleuropneumoniae* serotyping". *J. Clin. Microbiol.* 16(5): 840-843.
57. Rosendal, S., & Mitchel, W. R. (1983) "Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: A souvey of Ontario pork production". *Canad. J, Comp. Med.* 47: 1-5.
58. Rosendal, S., & Mittal, K.R. (1985) "Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria". *Canad. J. Comp. med.* 49: 68-74.
59. Sanford, S.E., & Josephson, G.K.A. (1981) "Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* epizootic in southwestern Ontario: clinical, microbiological pathological and some epidemic findings". *Canad. J. Comp. Med.* 45: 2-7.
60. Schultz, R.A. (1982) "Prevalence of antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* in Iowa swine. *A.J.V.R.* 43: 1848-1851.
61. Sebunya, T.N.K., & Saunders, J.R. (1982) "*Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: A review". *J.A.V.M.A.* 182: 1331-1337.

62. Sebuya, K., Saunders, J.R., & Osborne, A.D. (1983) "A model aerosol exposure system for induction of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*". *Canad. J. Comp. Med.* 47: 48-53.
63. Shope, R.E. (1964) "Porcine contagious pleuropneumonia I y II. Experiment transmission, etiology and pathology". *J. Exp. Med.* 19: 357-368.
64. Straw, B., Shin, S., Callitton, D., & Peterson, M. (1985) "Comparison of tissue reaction produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvant in swine". *Canad. J. Comp. Med.* 49: 149-151.
65. Tenorio, G.V., Falcón, N.A., Ciprián, C.A. y Camacho, M.J. (1987). *Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria en México*. México, D.F. 1987. pp9. SARH – UNAM. México, D.F.
66. Torres, O., Mendoza, S., Ayala, G., & Ciprián, A. (1992). Serological diagnostic with "PLEUROTTEST<sup>MR</sup>" and microbiological study of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in samples collected at slaughterhouse. *Proceedings 12 th. International Pig Veterinary Society, 1992*. The Hague, The Netherlands. P, 224.
67. Udeze, T.A. and Kadis S. (1987). Effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* haemolysin on porcine neutrophil function. *Infect Immune.* 60 1558-1567.
68. Utrera, V., Pijoan, C. 1991. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolates from pig respiratory tracts. *Vet. Record.* 128:357.
69. Utrera, V., Pijoan, C. 1994 Agar hemolysis inhibition assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig serum. *Proceedings 12 th Int. Pig Vet. Soc. The Hague, The Netherlands, 224.*