



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

“Identificación de patógenos respiratorios del cerdo en el ambiente que los rodea, en granjas porcícolas del estado de Aguascalientes”

Tesis que presenta

Biol. Victor Manuel Loera Muro

Para optar el grado de Doctor en Ciencias

Doctorado Directo en Ciencias Biológicas

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera (Tutora)

Dra. Elsa Marcela Ramírez López (Co-tutora)

Dr. Francisco Javier Avelar González (Asesor)

Aguascalientes, Ags. A 13 de Febrero de 2013

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AUTORIZACIONES



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Presente.

Por medio de este conducto hacemos constar que el Biol. Víctor Manuel Loera Muro, ha cumplido con todos los requisitos de escritura y revisión de tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Biológicas con la tesis: "Identificación de patógenos respiratorios del cerdo en el ambiente que los rodea, en granjas porcícolas del Estado de Aguascalientes".

Después de revisar y corregir su escrito hacemos constar que el Biol. Loera Muro incorporó todas las recomendaciones realizadas por el comité tutorial y brindamos nuestro voto aprobatorio para que proceda a los trámites correspondientes para la impresión de tesis y la obtención de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., 8 de febrero de 2013.

Vo.Bo. Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera. Tutora.

Vo.Bo. Dra. Elsa Marcela Ramírez López. Cótutora.

Vo. Bo. Dr. Francisco Javier Avelar González



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

BIOL. VICTOR MANUEL LOERA MURO,
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Loera:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "Identificación de patógenos respiratorios del cerdo en el ambiente que los rodea, en granjas porcícolas del estado de Aguascalientes", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 8 de febrero de 2013.
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda

Dear Dr Alma L Guerrero Barrera

Microbiology paper mic/2012/057992: Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms.

I am pleased to tell you that your paper is now acceptable for publication. Further processing of the paper will now be dealt with by the Microbiology Editorial Office, who will check that they have all the files needed for publication, and contact you if anything else is required.

A signed copyright assignment form will be required before publication can proceed. Please download the copyright assignment form at <http://mic.sgmjournals.org/site/misc/cFORM.pdf> (you can use the link in the

Author area of the manuscript tracking system), obtain the necessary signature(s), and return the form to the

Editorial Office by mail or fax (address details are on the form), by e-mail to micro.proofs@sgm.ac.uk, or as a supplementary file upload via the manuscript tracking system.

Please remember to include the paper number on the form.

IMPORTANT:

The journal has a Papers in Press feature where accepted manuscripts appear online in an unedited format before they are scheduled to appear in print. Unless you inform the editorial office otherwise

(submit.mic@sgm.ac.uk), they will assume that you agree to your manuscript being used in this way.

The details you have entered into the Bench>Press site, such as the manuscript title, subject category and author details, and the PDF used for peer review will be used to generate the Papers in Press record.

Thank you for submitting your paper to Microbiology. I hope that you will consider the journal for publication of future papers.

Yours sincerely

Professor David Gally

Microbiology

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, por haberme dado la oportunidad de empezar esta aventura y por permitirme acabarla, por la amíctades que me puso en este largo camino y por darme la fuerza e inteligencia para sortear los momentos complicados en este proyecto y en todos en mí vida.

Gracias a Sandra Luz, primeramente por ser mí esposa y el gran amor de mí vida, por el apoyo que desde hace 10 años hasta ahora me ha brindado en cualquier circunstancia. Gracias por haber cambiado mí vida. Este logro es de los dos.

Quiero agradecer mis papas, Lourdes Muro y Víctor Loera, porque han sido mí ejemplo de vida, por las grandes enseñanzas, porque todos mis logros son gracias a ellos, porque siempre han estado conmigo no importa la situación y porque este Doctorado es suyo papas... Los amo.

Gracias a mí hermano Abraham y mí cuñada Sandra, que me alentaron y además me dieron sabiduría en los momentos que parecía atorado. Mí Brother que desde que llegó a la familia me ha apoyado y ha sido, mí compañero de siempre; sigues tu Bro. A toda mí familia, por apoyarme en todo momento, mis tíos, primos, sobrinos. Gracias. A Tadeo y Ninfa, que sin saberlo siempre me daban felicidad y más en los momentos más difíciles.

A mí tutora Alma Lilián Guerrero, por guiarme desde ya hace mucho, mucho tiempo en este camino de la investigación. Por sus consejos, regaños y tiempo.

A Alejandra Medina, Marcela Morfin, Manuel González, y Abril Miranda, porque esta tesis y este artículo son también suyos, fueron partícipes importantes en diferentes partes de este proyecto. Sin ustedes, no lo habría finalizado. Gracias también a Cristina Garcidueñas y Cesar.

A mis amigos, los Biopuercos, por su impulso y ayuda incondicional no solo aquí, sí no desde siempre. Gracias Amigos. A mis amigos del Laboratorio 203 y del edificio 52, muchas gracias.

A mis asesor, el Dr. Javier Avelar y al GREMIP de la Universidad de Montreal, Canadá, a mí asesor Mario Jaques, así como a Yannick, por su apoyo en tierras lejanas. Gracias a mis asesores y sinodales de Tesis. Al departamento de Fisiología de la UAA y al Centro Escolar el Encino, a mis compañeros de ese departamento y ese gran colegio, gracias por su apoyo y ánimo.

Y a todas las personas e instituciones que de uno u otro modo me alentaron, porque ese pequeño empujón, se convirtió en una meta cumplida.

“La perseverancia es la madre de todas las virtudes”

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado:

***A** mi gran amor y esposa Sandra Luz, a mis amados*

padres y a mi súper brother Abraham.

“Alégrate mucho, yo he vencido al mundo”

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN EN ESPAÑOL	9
RESUMEN EN INGLES (SUMMARY)	10
1- INTRODUCCIÓN	11
2- ANTECEDENTES	13
2.1- La industria porcícola.	14
2.2- Problemas de la industria porcícola.	17
2.3- Enfermedades respiratorias del cerdo.	18
2.4- Patógenos respiratorios del cerdo.	20
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae.</i>	20
<i>Streptococcus suis.</i>	22
<i>Pasteurella multocida.</i>	23
<i>Bordetella bronchiseptica.</i>	25
<i>Haemophilus parasuis.</i>	26
<i>Mycoplasma hyopneumoniae.</i>	28
Coronavirus Porcino (PRC).	29
Circovirus Porcino (PCV).	31
Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV).	32
Virus de la Influenza porcina (SIV).	34
2.5- Identificación microbiana y pruebas bioquímicas.	36
Inmunoserología.	37
Inmunocitoquímica indirecta.	37
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	37
Hibridación <i>in situ</i>	39
3- JUSTIFICACIÓN	41
4- HIPÓTESIS	42

5- OBJETIVOS	43
5.1- Objetivo general.	44
5.2- Objetivos específicos.	44
6- MATERIAL Y MÉTODOS	45
6.1- Diseño general del proyecto.	46
6.2- Selección de granjas y toma de muestra.	47
6.3- Proceso de la muestra.	48
6.4- Extracción de ácidos nucleicos.	50
6.4.1- Extracción de ADN.	50
6.4.2- Extracción de ARN.	51
6.5- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para:	52
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	53
<i>Bordetella bronchiseptica</i> .	53
<i>Haemophilus parasuis</i> .	54
<i>Pasteurella multocida</i> .	54
<i>Streptococcus suis</i> .	55
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	55
Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV).	56
Virus de la Influenza porcina (SIV).	56
Circovirus porcino (PCV).	57
Coronavirus Porcino (PRCV).	58
6.6- Pruebas de viabilidad en agua de consumo.	58
6.7- Obtención de anticuerpos anti-App.	59
6.8- Reconocimiento específico de App en agua de consumo usando anticuerpos policlonales.	60
6.9- Hibridación <i>in situ</i> y WGA	60
6.10- Microscopia electrónica de barrido (MEB).	62
7- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
7.1- Muestreo de granjas.	64

7.1.1- Muestras y extracción de ácidos nucleicos.	64
7.1.2- Pruebas controles para la identificación de patógenos respiratorios bacterianos.	66
7.1.3- Identificación de patógenos respiratorios de tipo bacteriano.	71
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	71
<i>Haemophilus parasuis</i> .	72
<i>Pasteurella multocida</i> .	73
<i>Streptococcus suis</i> .	74
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	75
7.1.4. Pruebas controles para la identificación de patógenos respiratorios de origen viral.	77
7.1.5 Identificación de patógenos respiratorios de origen viral:	78
Circovirus porcino tipo 2 (PCV2).	78
Coronavirus Porcino (PRCV).	79
Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV).	80
Virus de la influenza porcina (SIV).	80
7.1.6 Identificación de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en agua de consumo de granjas porcícolas.	85
Viabilidad celular de las muestras de agua de consumo.	85
Cultivo de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> proveniente del agua de consumo	86
Identificación de <i>Actinobacillus</i> mediante inmunotinción	86
Biopelículas en agua de consumo	87
Hibridación <i>in situ</i> .	88
8- CONCLUSIONES	93
9- GLOSARIO	94
10- BIBLIOGRAFÍA	104
11- ANEXOS	121
11.1- Procedimiento para la toma y envío de muestras de las granjas porcícolas.	
11.2- Artículo publicado.	

ÍNDICE DE TABLAS

PROCESO DE LA MUESTRA

Tabla 1. Cepas de referencia usadas como controles positivos para las pruebas diagnosticas de PCR.	50
Tabla 2. Cepas de referencia usadas como controles positivos para las pruebas diagnosticas de PCR, RT-PCR.	52
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR anidado en contra de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> usando el gen <i>apxIV</i> como blanco.	53
Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR en contra de <i>B. bronchiseptica</i> usando el gen <i>flaA</i> como blanco.	54
Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR en contra de <i>H. parasuis</i> usando un gen <i>16s ARNr</i> especifico como blanco.	54
Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR en contra de <i>P. multocida</i> usando el gen <i>toxA</i> como blanco.	55
Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR múltiplex en contra de <i>S. suis</i> usando los genes <i>16S</i> ribosomal y <i>cps2J</i> como blancos.	55
Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR en contra de <i>M. hyopneumoniae</i> usando el gen <i>16S</i> ribosomal como blanco.	56
Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el RT-PCR en contra de PRRSV, usando el gen <i>Orf 5</i> como blanco.	56
Tabla 10. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el RT-PCR en contra de SIV, usando los genes <i>H1, H3, N1, N2</i> como blancos.	57
Tabla 11. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el RT-PCR en contra de PCV, usando los genes <i>Orf1</i> y <i>Orf 2</i> como blancos.	57
Tabla 12. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el RT-PCR en contra de PRVC, usando los genes <i>Orf1b</i> y <i>Orf1 b N</i> como blancos.	58
MUESTREO DE GRANJAS	
Tabla 13. Número total de muestras obtenidas y procesadas.	64
Tabla 14. Número total de muestras obtenidas y procesadas.	65

Tabla 15. Cuantificación y calidad promedio de ADN usando espectrofotometría (λ 280 y λ 260). **65**

Tabla 16. Resultados obtenidos por patógeno y por muestra. **77**



ÍNDICE DE FIGURAS

ANTECEDENTES

Fig. 1. Producción de carne para consumo humano en el Mundo en 2011.	14
Fig. 2. Principales países productores de carne de cerdo en el mundo.	15
Fig. 3. Producción de ganado en México 2010.	16
Fig. 4. Producción de ganado porcino en México 2000- 2009.	16
Fig 5. Principales estados productores de carne de cerdo en México	17
Fig. 6. Diversos factores que afectan calidad de salud de los cerdos en una granja de producción intensiva.	19
Fig. 7. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	21
Fig. 8. <i>Streptococcus suis</i> .	23
Fig. 9. <i>Pasteurella multocida</i> .	25
Fig. 10. <i>Bordetella bronchiseptica</i> .	26
Fig. 11. <i>Haemophilus parasuis</i> .	27
Fig. 12. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	29
Fig. 13. Coronavirus porcino.	30
Fig. 14. Circovirus porcino.	32
Fig. 15. Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino.	34
Fig. 16. Virus de la influenza porcina	36
Fig. 17. Etapas del proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	39

MATERIAL Y METÓDOS

Fig. 18. Resumen general de la organización del proyecto.	46
Fig. 19. Distribución de las granjas muestreadas en el presente estudio.	48
Fig. 20. Diagrama de flujo del muestreo realizado en las granjas porcícolas bajo estudio.	49

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fig. 21. Aislamiento de ADN y ARN de diferentes muestras ambientales provenientes de las granjas porcícolas bajo estudio. **67**

Fig. 22. Productos amplificados de PCR para *Mycoplasma hyopneumoniae* (MH649). **67**

Fig. 23. Productos amplificados de PCR anidado para *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHP). **68**

Fig. 24. Productos amplificados de PCR (anidado) para *A. pleuropneumoniae* (APXIVAN). **68**

Fig. 25. Productos amplificados de PCR para *Pasteurella multocida* (ToxA). **69**

Fig. 26. Producto amplificado de PCR para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APXIVAV) marcados con fluoresceína (hibridación). **69**

Fig. 27. Productos amplificados de PCR para *Haemophilus parasuis* (HPS). **70**

Fig. 28. Productos amplificados de PCR para *Streptococcus suis* (16s RNA y cpsJ2). **70**

Fig. 29. Productos amplificados de PCR para *Pasteurella multocida* (KMT1). **71**

Fig. 30. Productos amplificados de PCR (377 pb), para la bacteria *A. pleuropneumoniae*. **72**

Fig. 31. Productos amplificados de PCR (821 pb), para la bacteria *H. parasuis*. **73**

Fig. 32. Productos amplificados de PCR (338 pb), para la bacteria *P. multocida*, usando los primers TOXA. **74**

Fig. 33. Productos amplificados de PCR (cps2J 459 pb y 16s ARNr 294 pb), contra la bacteria *S. suis*. **76**

Fig. 34. Productos amplificados de PCR (MHP 807 pb), contra la bacteria *M. hyopneumoniae*. **76**

Fig. 35. Producto amplificado de PCR contra PCV2 usando oligonucleótidos contra ORF2 (667 pb). **78**

Fig. 36. Productos amplificados de PCR (ORF2 667 pb), contra el circovirus porcino tipo 2 **79**

Fig. 37. PCR contra TGE (325-385 pb) y PRCV **80**

Fig. 38. Productos amplificados de PCR (ORF7 448 pb), contra el PRRSV. **81**

Fig 39. PCR mutiplex contra SIV **81**

Fig. 40. Prueba de viabilidad en las biopelículas presentes en el agua de consumo de las granjas porcícolas realizada con el Kit- Live/Dead. **85**

Fig. 41. Marcaje de las biopelículas provenientes del agua de consumo de las granjas porcícolas. **85**

Fig. 42. Biopelícula bacteriana formada en el agua de uso de una granja porcícola observadas en microscopio electrónico de barrido **87**

Fig. 43. Control negativo de autofluorescencia en biopelículas de App (serotipo 5B) y Control negativo en biopelículas de *B. bronchiseptica* (276). **90**

Fig. 44. Biopelículas de App (serotipo 5B) y biopelículas de App 5B + *B. bronchiseptica* (276). **91**

Fig. 45. Detección de App usando FISH en biopelículas aislados de agua de consumo de granjas porcícolas. **92**



RESUMEN

Los patógenos respiratorios son el principal problema de salud para la industria porcícola a nivel mundial y provocan grandes pérdidas económicas anuales. Algunos de los patógenos más importantes son *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, el virus del Síndrome reproductor y respiratorio porcino, circovirus porcino, especialmente el tipo 2, el virus de la influenza porcina y el coronavirus porcino. Estos patógenos se dispersan entre los animales por contacto directo o mediante la dispersión de aerosoles a corta y larga distancia. Poco se conoce si el ambiente de las granjas porcícolas que rodea al cerdo funge como vehículo de dispersión o reservorio de estos patógenos. El objetivo del presente trabajo fue el de identificar los principales patógenos respiratorios porcinos en el ambiente de las granjas que rodea a los cerdos, en 17 granjas porcícolas del estado de Aguascalientes, México, usando análisis por PCR y RT-PCR, con oligonucleótidos específicos para cada patógeno bajo estudio. De esta forma, se demostró la presencia de *A. pleuropneumoniae*, *S. suis* y *P. multocida*, así como el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino y el virus de la influenza porcina en el ambiente circundante a los animales en las 17 granjas bajo estudio. En conclusión, de acuerdo a los resultados obtenidos en la presente tesis, el ambiente de las granjas funge como reservorio y un posible vehículo de dispersión de estos patógenos que debe de ser considerado para la prevenir y controlar las enfermedades respiratorias en las granjas porcícolas del Estado de Aguascalientes.

SUMMARY

Respiratory pathogens are the main health problem that affects the swine industry worldwide, causing great economic losses every year. Some of the most important pathogens are *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus, specially type 2, swine influenza virus and porcine coronavirus. These pathogens are known to disperse among animals by direct contact or by aerosol to short and long distances. So far little is known if the environment of hog farms surrounding the pig serves as a vehicle for spreading or reservoir of these pathogens. The aim of this study was to identify the major swine respiratory pathogens in the environment surrounding the pigs, in Aguascalientes Mexico, using specific analysis of PCR and RT-PCR. Thus, is showed the presence *A. pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, respiratory syndrome virus and swine influenza virus in the environmental that surrounding the pigs in studied farms. According to the results, the environment serves as reservoir and a possible vehicle for dispersion of these pathogens in farms that should be considered to prevent and control the spreading of these pathogens in 17 Aguascalientes swine farms.



INTRODUCCIÓN

La porcicultura es la principal industria cárnica en el mundo. Su producción supera a las industrias pecuarias de ganado bovino y aviar (Lyoo *et al.*, 2001). Para México, esta industria ocupa el tercer lugar por debajo del ganado aviar y ganado vacuno (Méndez-Medina *et al.*, 2003). Su éxito debe a la calidad de la carne, fuente importante de proteínas para la dieta de habitantes de diversos países en el mundo, incluido México. Sin embargo, diversos problemas afectan su producción, en especial los problemas sanitarios. Las enfermedades respiratorias en los cerdos constituyen la principal causa de pérdida económica para la porcicultura en el rubro de sanidad, debido al aumento de la mortalidad y morbilidad de los animales (Lyoo *et al.*, 2001). Dentro de estas enfermedades, destacan la influenza porcina (SIV), el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), la neumonía enzoótica, la pleuroneumonía y la rinitis atrófica (MacInnes *et al.*, 2008). Los patógenos causales de estas enfermedades, en su gran mayoría, requieren para su dispersión el contacto directo entre los animales o bien la formación de aerosoles. Hasta la fecha, se conoce poco si el ambiente de las granjas en las que se desarrollan los cerdos, como el agua, el alimento, el suelo y el aire, sirven como reservorio natural o como medio de dispersión para estos patógenos. El objetivo general del presente trabajo fue identificar los principales patógenos respiratorios del cerdo en el exudado nasal de los animales, así como en el ambiente de las granjas, como el agua de consumo, suelo, aire, alimento y orina, a través del análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, RT-PCR) usando oligonucleótidos específicos para cada patógeno bajo estudio, en 17 granjas porcícolas distribuídas a lo largo del Estado de Aguascalientes, México.



ANTECEDENTES



2.1 La Industria Porcícola

El cerdo (*Sus scrofa domesticus*), mamífero de tamaño mediano alcanza 1.80 m de longitud. Ocupa el primer lugar como animal productor de carne en el mundo, debido a su corto periodo de gestación (114 días), alta tasa reproductiva (24- 30 lechones/hembra/año), corta edad de sacrificio (4-5 meses), su poder de adaptación, actualmente es el mamífero mas distribuido en el mundo. En cualquier grado de especialización de producción, en pequeña o gran escala, posee alta eficiencia biológica en la transformación de los alimentos en carne. Consume gran variedad de alimentos, su carne constituye una fuente de proteína de alta calidad en la dieta de las personas en muchos países del mundo, incluido México. El sabor de la carne de cerdo y su gran aceptación en el mercado mundial, la coloca en primer lugar en consumo en el orbe. Gran variedad de productos se derivan del cerdo como carne, jamones, tocinos, chuletas, salchichas y chorizos **(Fig.1)** (Araque, 2009; Dyce et al., 1999; Méndez-Medina et al., 2003; Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura –FIRA-). Recientemente, la producción de cerdo en el mundo se ha incrementado, favorecida por los sistemas de libre comercio. Los principales productores y exportadores de carne de cerdo en el mundo son China, Estados Unidos, Alemania, Brasil y Canadá **(Fig. 2)**. China es el principal productor de cerdos, aporta el 50% de la producción mundial, mientras que Japón, México y Rusia son los principales países importadores de cerdo (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAOSTAT), 2011; Orr y Shen, 2006).

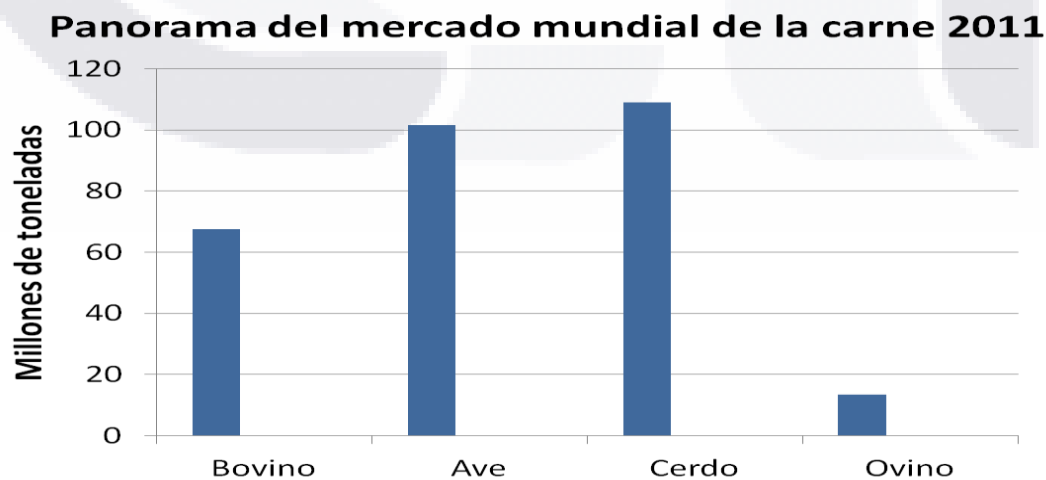


Fig. 1. Producción de carne para consumo humano en el Mundo en 2011 (FAOSTAT, 2011).

Principales países productores de carne de cerdo en 2010

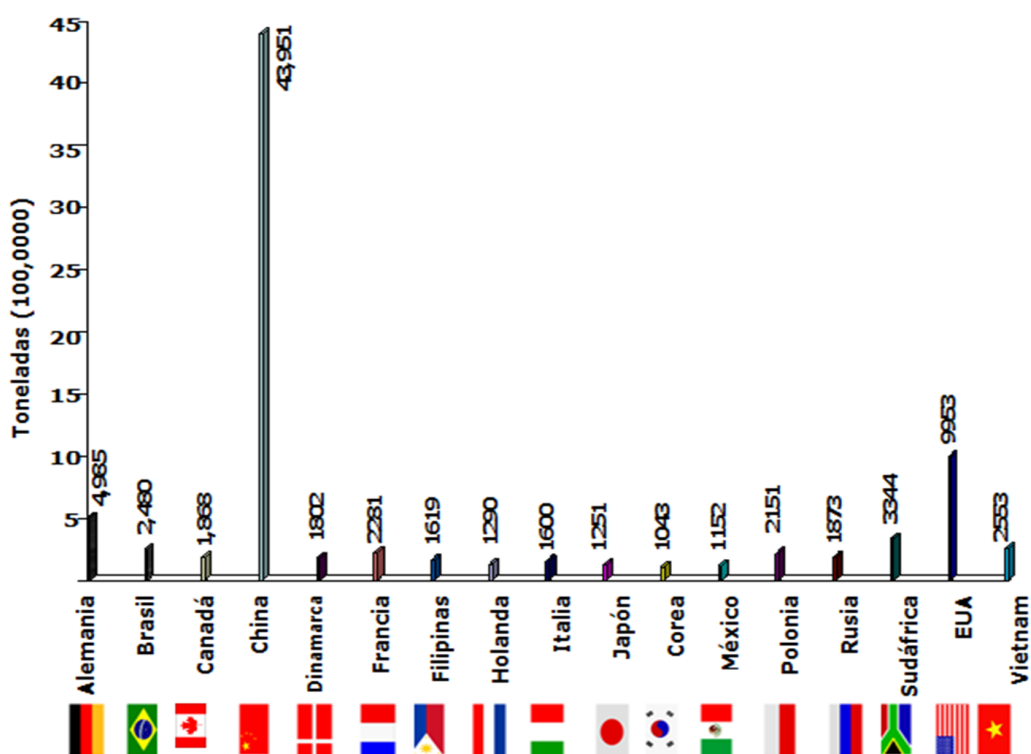


Fig. 2. Principales países productores de carne de cerdo en el mundo en 2010. México ocupa el lugar 16 (FAOSTAT, 2011).

Como se mencionó en México la producción de la carne de cerdo ocupa el tercer lugar, superada por la producción de carne de Bovino y de pollo (**Fig. 3**). Ésta producción representó una derrama económica cercana a los 9 billones de pesos en 2005. Actualmente la mayor parte de la producción de carne en el país se realiza en siete estados; Jalisco, Sonora, Guanajuato, Yucatán, Veracruz, Puebla y Michoacán, los cuales producen el 75% del total del país. En Jalisco y Sonora recae principalmente la producción nacional, ya que concentran el 40% de la producción total (**Fig. 4 y 5**) (Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura, 2010). Aguascalientes ocupa el 10º lugar en la producción de porcinos, aporta cerca del 3.0% de la producción nacional.

En el año de 2005 se sacrificaron 145 567 cerdos, que corresponden al 50.23% de la producción de toneladas de carne en canal en los rastros estatales, las cuales significaron un ingreso de \$271 846 000.00 (MN) (INEGI, 2005).

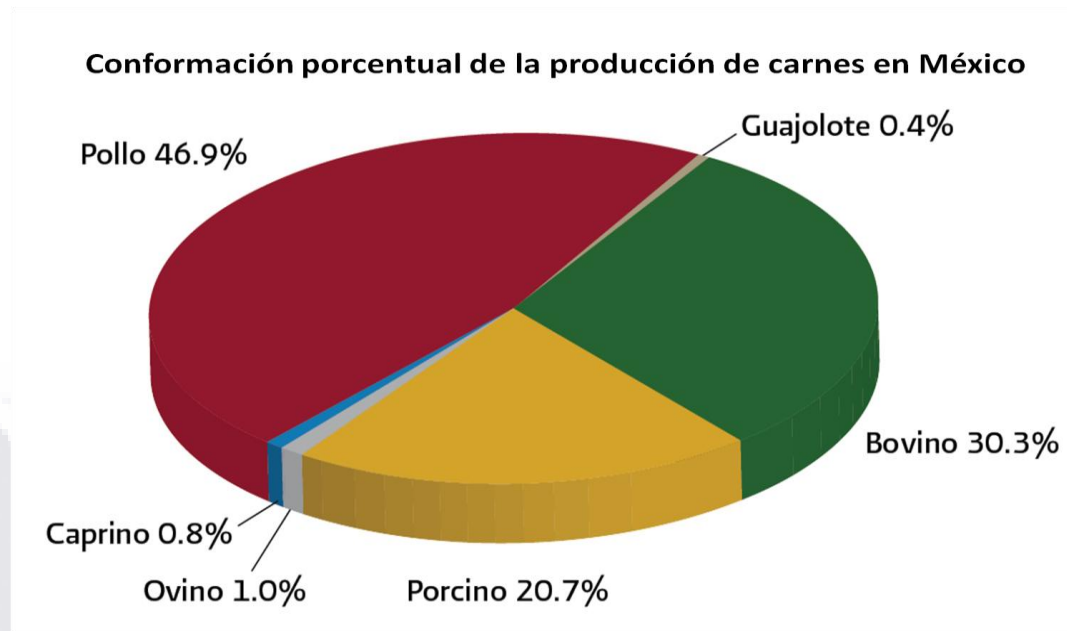


Fig. 3. Producción de ganado en México 2010 (Tomado de Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura, 2010).

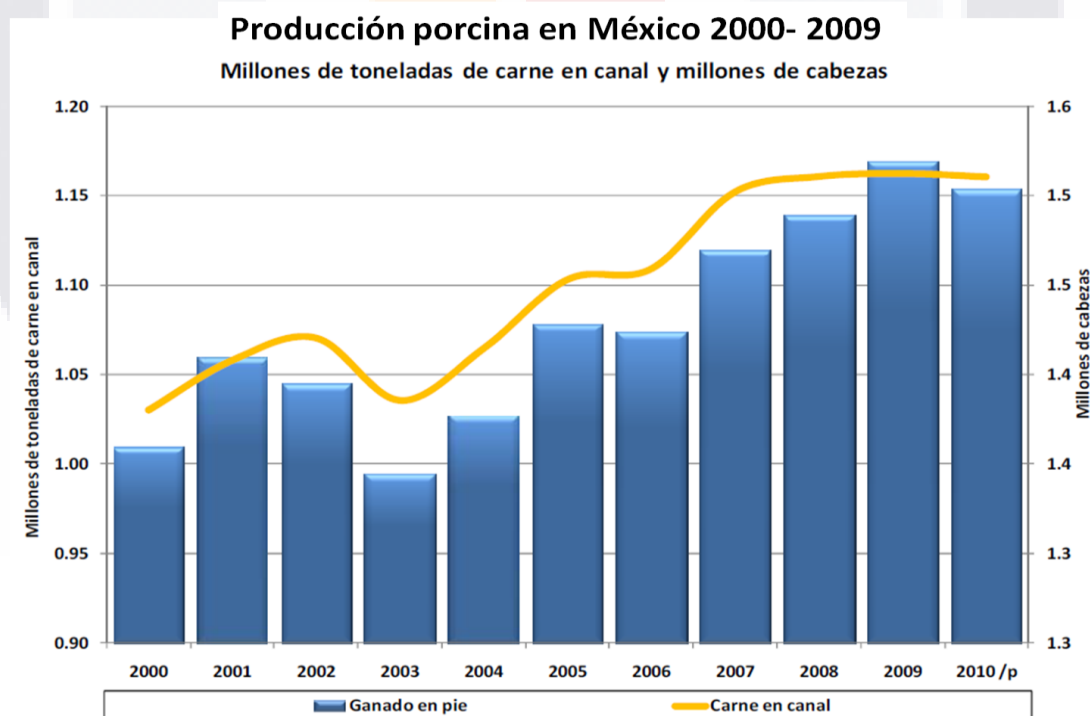


Fig. 4. Producción de ganado en porcino México 2000-2009 (Tomado de Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura, 2010).

Producción de carne de porcino en México 2010

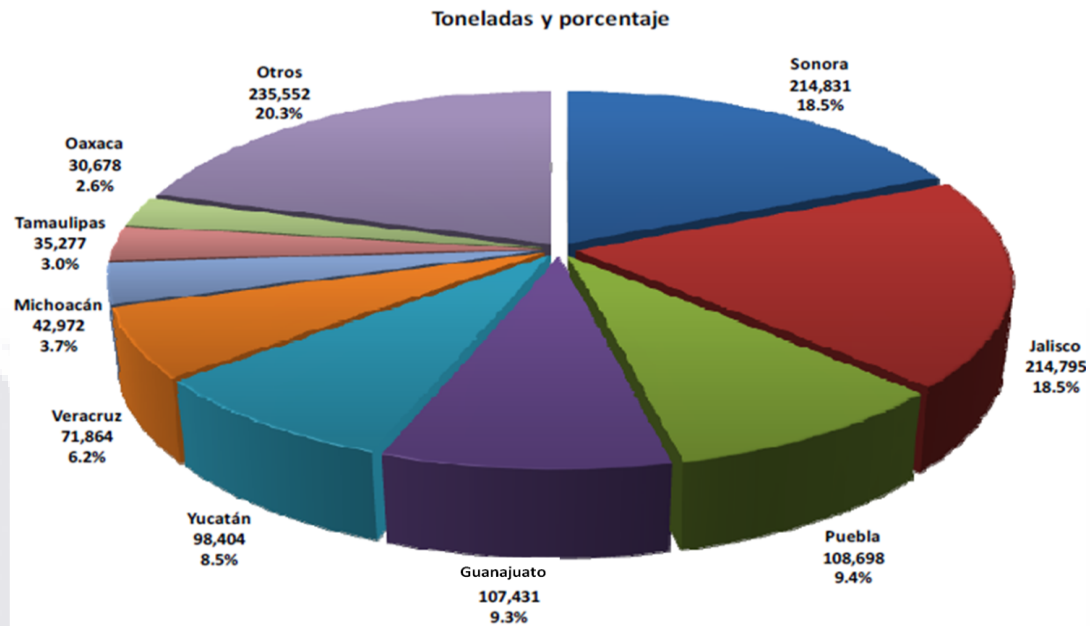


Fig. 5. Principales estados productores de carne de cerdo en México para 2010 (Tomado de Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura, 2010).

2.2 Problemas de la Industria Porcícola



Debido a la gran demanda de carne de cerdo en el mundo, su producción es intensiva y diversos factores la afectan. Como las infecciones concurrentes causadas por uno o más patógenos respiratorios de origen viral o bacteriano (Yue *et al.*, 2009). Las enfermedades respiratorias porcinas, son el principal problema de salud para la industria porcícola pues provocan baja conversión alimentaria, alta morbilidad y mortalidad e incrementan los gastos en vacunación. En Estados Unidos el virus de síndrome reproductor y respiratorio porcino ocasiona pérdidas de \$560 millones de dólares al año. Mientras *Streptococcus suis* causa pérdidas de alrededor de \$300 millones de dólares anuales (Hermann *et al.*, 2007; Marois *et al.*, 2007). Las enfermedades respiratorias se distribuyen en todos los países y climas con producción intensiva de cerdos. Alcanzan valores de prevalencia de hasta el 100%. Para el 2006, estas enfermedades representaron la mayor causa de muerte en los cerdos, con mortalidades mayores del 50% en lechones y cerdos jóvenes y 60% en cerdos en engorda o de salida (Lobo, 2005; Nicholson *et al.*, 2009). De igual forma, el transporte de animales o

productos derivados para incrementar el número de cabezas de cerdos, o para incorporar reproductores de alto valor energético, ha crecido en los últimos años para satisfacer las necesidades alimenticias de los países. Una de las formas más eficaces para la transmisión de patógenos respiratorios, bacterias o virus, es a través del movimiento de animales infectados hacia una población de cerdos desprotegida. Comienza por el transporte de un solo animal desde una piara a otra, o por la importación de animales de un país a otro. Así los patógenos de mayor importancia son los endémicos en la población de origen, no están presentes en la población receptora. Para evitar la transmisión de estos patógenos, existen protocolos de bioseguridad, que incluyen chequeos sanitarios de rutina y análisis serológicos; un periodo de aislamiento de los cerdos que se introducen a la nueva granja, tiempo en el cual se le deberán realizar estudios; registrar similitudes entre el estado sanitario entre piaras de origen y el de destino y se brinda seguimiento sanitario serológico de las piaras de destino (Morilla *et al.*, 2004).



2.3 Enfermedades Respiratorias del Cerdo

El tracto respiratorio del cerdo se comunica de manera directa con el ambiente exterior y puede ser el sitio de entrada para gran diversidad de microorganismos patógenos. Como primera línea de defensa del tracto respiratorio se encuentra la barrera epitelial la cual presenta cilios, producción de mucosidad, sustancias antimicrobianas y batido ciliar que impiden la entrada de patógenos (Erles & Brownlie, 2009). Un número importante de bacterias potencialmente patógenas pueden residir en el tracto respiratorio como flora comensal. En condiciones de inmunosupresión estos microorganismos pueden causar graves enfermedades y dispersarse a otros animales de la piara, en especial a animales de edades o condiciones de salud susceptibles. De esta forma, la interrelación patógeno-hospedero está influenciada por múltiples factores, como las condiciones ambientales en donde se desarrolla el cerdo. Estas condiciones son el hacinamiento, enfriamiento de aire, ventilación de la granja, temperatura ambiental, edad del cerdo, presencia de inmunidad pasiva (anticuerpos), inmunidad innata y adquirida, e infecciones recientes, además del tipo de patógeno y de su grado de virulencia (MacInnes *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2008; Auger *et al.*, 2009; Kahlisch *et al.*, 2009). Debido a lo anterior, las enfermedades respiratorias porcinas son consideradas un problema multifactorial, causadas por una combinación de agentes infecciosos de origen

viral y bacteriano, así como de condiciones ambientales adversas (Brockmeier *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 2009). La afectación del aparato respiratorio del cerdo rara vez es el resultado de la acción de un solo patógeno, si no una compleja interacción en que se ven involucrados gran número de agentes por lo que comúnmente se habla de un complejo respiratorio porcino (**Fig. 6**) (PRCD: por sus siglas en inglés: "porcine respiratory complex disease") (Lobo., 2005; Ogawa *et al.*, 2009).

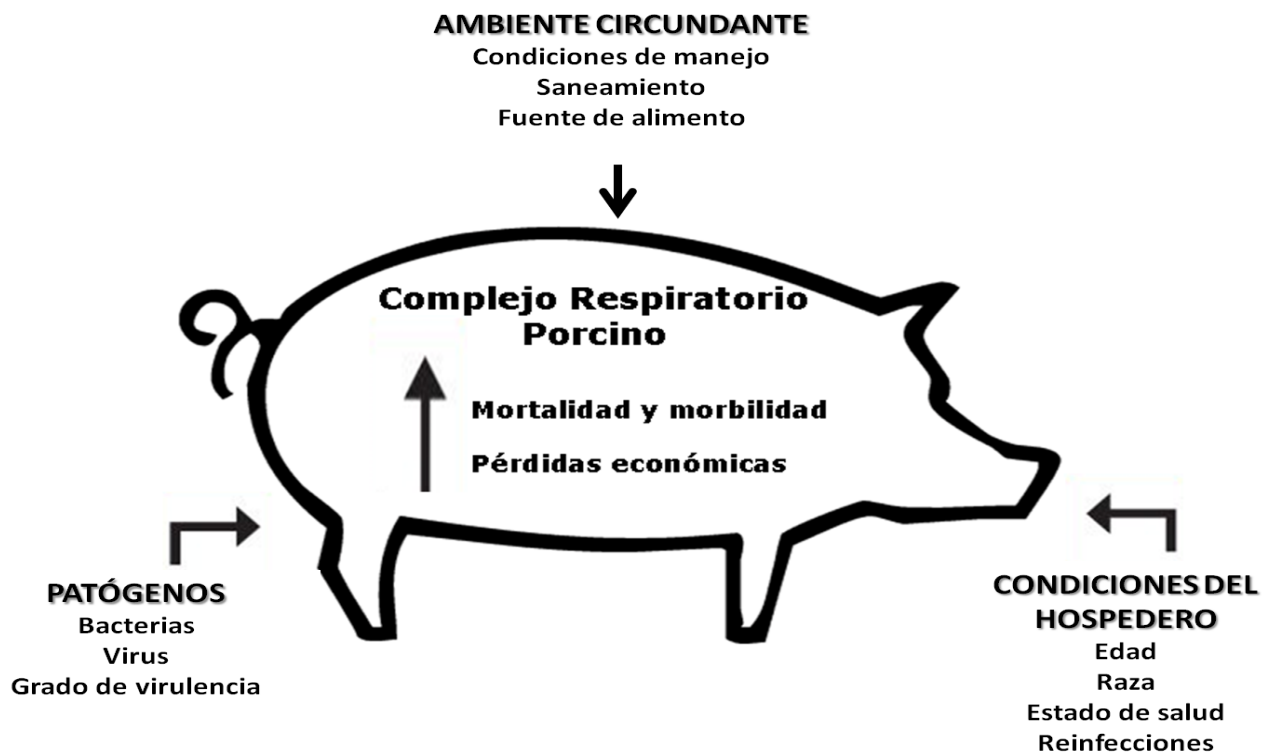
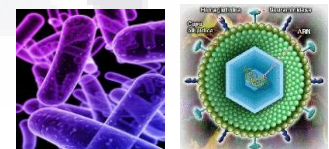


Fig. 6. Factores que afectan la salud respiratoria de los cerdos en una granja de producción intensiva (Cai *et al.*, 2007; Lobo, 2005; Palzer *et al.*, 2008).

El término de complejo respiratorio de enfermedades porcinas (PRDC: por sus siglas en inglés "porcine and respiratory disease complex"), es usado para describir la neumonía provocada por múltiples causas etiológicas, causando muertes de los animales o pérdida de peso en la etapa final de la producción. Como se mencionó anteriormente, de manera habitual numerosos microorganismos patógenos potenciales, colonizan la cavidad nasal de los cerdos. Sin embargo, los mecanismos de defensa de los animales impiden el daño o la migración hacia los pulmones. De acuerdo a la capacidad de daño que va acorde con el grado de virulencia, los agentes infecciosos respiratorios de los cerdos se clasifican en dos grupos. Los

patógenos primarios, capaces de sobrevivir al ataque del sistema de defensa del cerdo y generar infección. Y los patógenos oportunistas, que aprovechan la virulencia de los patógenos primarios ya establecidos, así como el daño provocado en el tracto respiratorio para sucederlos en la infección (Brockemeier *et al.*, 2002). Los patógenos primarios incluyen agentes como el virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (PRRSV: por sus siglas en inglés, "porcine respiratory and reproductive syndrom virus") (Díaz *et al.*, 2005) el virus de la influenza porcina (SIV: por sus siglas en inglés, "swine influenza virus") y circovirus porcino (PCV2: por sus siglas en inglés "porcine circo virus type 2"), además de bacterias como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Entre los agentes oportunistas más frecuentes se encuentran *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Actinobacillus suis* y *Arcanobacterium pyogenes*, así como el coronavirus respiratorio porcino (PRCV: por sus siglas en inglés, "porcine respiratory coronavirus"). Los factores no infecciosos, como el manejo de los animales y las condiciones ambientales, son muy importantes para el PRDC, pues incrementan la transmisión, la dispersión o crean condiciones favorables para la infección (como el estrés y el daño en las vías respiratorias). Corrales superpoblados y poca ventilación, incrementan el estrés de los animales, elevan los niveles de amonio y polvo que impacta negativamente las defensas del tracto respiratorio de los cerdos (Brockemeier *et al.*, 2002; Lobo, 2005). Como se ha expuesto, existen gran variedad de patógenos y condiciones ambientales que pueden desembocar en enfermedades respiratorias, en su mayoría culminan en neumonías. La neumonía es una enfermedad de las vías inferiores respiratorias, la cual se caracteriza por la inflamación de los pulmones, tos, taponamiento de las vías respiratorias, dificultad al respirar, baja en la producción y la muerte de animal (Lawhorn, 1998; Lobo, 2005; Opriesing *et al.*, 2011).

2.4. Patógenos respiratorios porcinos



Actinobacillus pleuropneumoniae

Cocobacilo Gram negativo, pleomórfico, anaerobio facultativo, que no forma esporas, es capsulado y móvil (Enriquez-Verdugo *et al.*, 2003; Negrete Abascal *et al.*, 2003) (**Fig. 7-A**). Patógeno específico del cerdo, agente etiológico de la pleuropneumonia porcina, enfermedad

que causa tos, necrosis pulmonar y pleuroneumonía fibrohemorrágica, y provoca serias pérdidas económicas en la industria porcícola mundial (**Fig. 7-B**). Dependiendo del estado de salud de los animales, la enfermedad puede ser hiperaguda, aguda o crónica (Auger *et al.*, 2009; Hennessy *et al.*, 1993; Hiroya, I., 2010; Jirawattanapong *et al.*, 2010; Lone *et al.*, 2009; Schuchert *et al.*, 2004). Las vacunas ofrecen protección parcial contra este patógeno (Hennessy *et al.*, 1993). Actualmente se conocen dos biovariedades debidas a su dependencia de NAD y 15 serotipos debidos los polisacáridos de superficie (Auger *et al.*, 2009; Hiroya, I., 2010; Schuchert *et al.*, 2004). Esta bacteria es capaz de evadir los mecanismos de inmunidad del pulmón del cerdo. Puede multiplicarse rápidamente y dispersarse en las piaras, en las cuales puede provocar la muerte de cerdos en 24 horas después de la infección siendo estos asintomáticos hasta la muerte (Lone *et al.*, 2009). Muchos factores de virulencia se han descrito para explicar esta patogénesis. Endotoxinas, exotoxinas, adhesinas, factores de colonización, sistemas de adquisición de hierro, proteasas, evasión de sistema inmune y destrucción de tejidos (Auger *et al.*, 2009; Kahlisch *et al.*, 2009; Lone *et al.*, 2009; Reiner *et al.*, 2010; Labrie *et al.*, 2010; Grasteau *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013). Las exotoxinas formadoras de poros llamadas Apx, que pueden ser citolíticas o/y hemolíticas, le dan el grado de virulencia a los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae*. Actualmente las toxinas ApxI y ApxII son las más tóxicas. Los serotipos 1, 5, 9 y 11 destacan entre los mas virulentos debido a que presentan ambas toxinas (Auger *et al.*, 2009). Los serotipos 1, 3, 5 y 7 son los mas frecuentes en Norte América (Canadá y Estados Unidos) (Hennessy *et al.*, 1993).

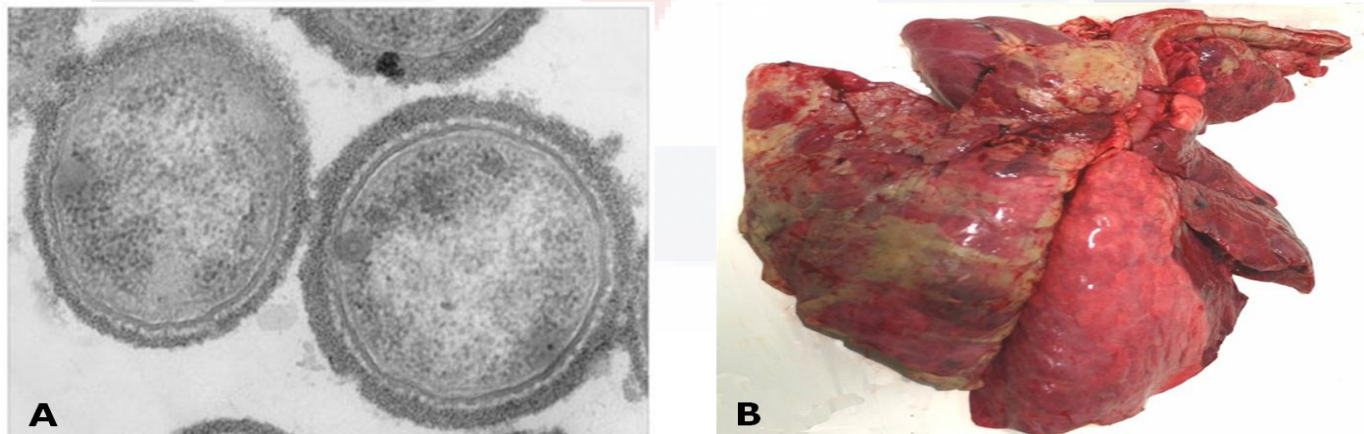


Fig. 7. *Actinobacillus pleuropneumoniae* micrografía electrónica y daño pulmonar. **A)** Se observa la cápsula de la bacteria. **B)** Se muestra el daño que provoca *A. pleuropneumoniae* en el pulmón, en el cual se muestra fibrino hemorragia (National Research Center of Antibiotics "NRCA", 2009).

Streptococcus suis

Streptococcus suis es un coco α -Hemolítico (**Fig. 8-A**), Gram positivo, anaeróbico facultativo, endémico en casi todos los países, es reconocido como uno de los principales patógenos respiratorios del cerdo y un agente zoonótico emergente (Feng *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008; Princivalli *et al.*, 2009; Fittipaldi *et al.*, 2012, Hoa *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2013). Además de ser responsable de grandes pérdidas económicas en la industria porcícola, en Estados Unidos, las pérdidas anuales son de aproximadamente \$300 millones de dólares, se tiene registro de brotes en humanos en diferentes partes del planeta, por el contacto con los cerdos o con sus productos (Feng *et al.*, 2010; Fittipaldi *et al.*, 2010; 2012; Han & Lu, 2009; Jiang *et al.*, 2009; Marois *et al.*, 2007). Basados en su polisacárido capsular, se han descrito 35 serotipos (1-34 y ½), sin embargo de todos ellos el serotipo 2 es el más comúnmente asociado a las infecciones en cerdos y humanos. Este patógeno causa neumonía, endocarditis, meningitis, artritis, septicemia y muerte súbita en cerdos (Garibaidi *et al.*, 2010; Han & Lu, 2009; Han, X.G. & Lu, C. P., 2009; Hu *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009; Princivalli *et al.*, 2009; Wisselink *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2009). Entre los principales factores de virulencia que se conocen esta el polisacárido capsular y factor de opacidad del suero. Otros factores menos virulentos son la suilisina, la proteína liberadora de muraminidasas, proteína extracelular, el pili y la proteína de unión al fibrinógeno-fibronectina (Garibaidi *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2009; Han & Lu, 2009; Hu *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). La importancia de este patógeno porcino es que además de provocar grandes pérdidas económicas en este sector, recientemente surge como un importante problema de salud pública, principalmente en Asia (China, Vietnam y Tailandia) (Fittipaldi *et al.*, 2010; 2012; Li *et al.*, 2009; Princivalli *et al.*, 2009; Wertheim *et al.*, 2009). Se tienen registros de aproximadamente 700 casos alrededor del mundo, de los cuales, la mayor parte de los afectados son porcicultores o trabajadores de rastros de cerdos. Estudios revelan que la probabilidad de riesgo de infección por esta bacteria en estos trabajadores es de 3/100,000 por año. En países como Vietnam, este patógeno es la causa mas común de meningitis en humanos adultos (Feng *et al.*, 2010; Wertheim *et al.*, 2009). *S. suis* produce en humanos el síndrome del shock tóxico estreptococal (por su siglas en inglés "STSS") (Gu *et al.*, 2009), el cual se caracteriza por meningitis, shock séptico, artritis, neumonía, endocarditis, endoftalmítis, peritonitis, se presentan petequias, salpullido, fiebre alta, hipotensión, diarrea,

disfunción de múltiples órganos (falla renal, hepática y cardíaca, estrés respiratorio y una diseminación de coágulos intravascular (**Fig. 8-B**) (Feng *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008).

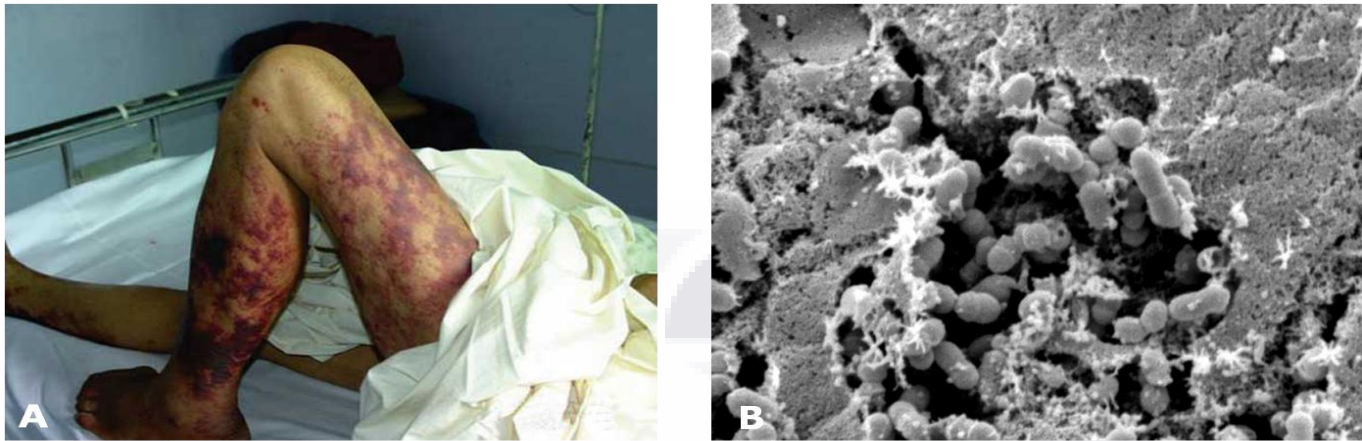


Fig. 8. *Streptococcus suis*, microorgrafía electrónica y daño macroscópico producido en el ser humano. **A)** Micrografía electrónica, obsérvese los cocos en pares (Lee *et al.*, 2008). **B)** Fotografía de un paciente con *S. suis*. Las piernas presentan un choque tóxico de *Streptococcus* (STSS) (Lee *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2006).

Pasteurella multocida

Cocobacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Pasteurellacea*, anaerobio facultativo e inmóvil (**Fig. 9-A**). Se distinguen tres subespecies (ssp.), *P. multocida* ssp. *multocida*, *P. multocida* ssp. *gallicida* y *P. multocida* ssp. *septica*, siendo la subespecie *multocida*, la más comúnmente encontrada en cerdos (Chomnawang *et al.*, 2009; Ewers *et al.*, 2006; Varga *et al.*, 2007). *Pasteurella multocida* es un patógeno asociado a gran variedad de especies animales. En ganado vacuno provoca septicemia hemorrágica, cólera en aves domésticas y silvestres y bronconeumonía en ovejas. Ocasionalmente hay infecciones en humanos por lo general al tener contacto con gatos o perros infectados, provocando linfagitis, artritis y abscesos. En pacientes inmuno comprometidos puede generar endocarditis y meningitis, además recientemente la toxina de esta bacteria se ha propuesto como un factor carcinogénico (Chomnawang *et al.*, 2009; Ewers *et al.*, 2006; Lax, 2012; Wilkie *et al.*, 2012). Esta bacteria es conocida como parte de la flora normal del cerdo, así como el agente causal de gran variedad de infecciones, generalmente después de infecciones primarias producidas por otros patógenos o factores ambientales. Todo esto deriva en un impacto severo en la economía.

En los cerdos causa rinitis atrófica progresiva (asociada a *Bordetella bronchiseptica*), así como de neumonías severas (Pasteurelosis) (Bethe *et al.*, 2009; Hallow *et al.*, 2005; Kalorey *et al.*, 2008; Lizaraso *et al.*, 2008; Miflin and Blackall, 2001; Ross, R., 2007; Tang *et al.*, 2009; Wilkie *et al.*, 2012). Las cepas de este microorganismo pueden ser separadas dentro de los serogrupos A, B, D, E y F, (genes *cap*) basados en la antigenicidad de sus cápsulas y en base a sus antígenos de lipopolisacárido en serotipos que van del 1 al 16 (Chomnawang *et al.*, 2009, Sellyei *et al.*, 2008). Por lo general los serogrupos A y D son comunes en cerdo, siendo el D el agente causal de la rinitis atrófica y el A causante de la neumonía enzootica (Harper *et al.*, 2006; Kalorey *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012).

Así las cepas tipo A pueden ser encontradas con frecuencia en los pulmones de los cerdos, en cambio las cepas del tipo D son aisladas mas frecuentemente de la cavidad nasal. La rinitis atrófica generalmente nunca provoca la muerte de los animales, pero provoca grandes pérdidas económicas debido a la baja conversión alimenticia en los animales enfermos (Harper *et al.*, 2006).

La enfermedad es caracterizada por estornudos frecuentes, total o parcial desaparición de los cornetes nasales, acompañada de distorsión facial y hemorragias nasales; las repercusiones en los índices productivos pueden ser graves (**Fig. 9-B**). La principal toxina asociada a esta enfermedad es la toxina dermonecrótica (DNT +), codificada por el gen *tox A* (Kamp *et al.*, 1996; Hsuan *et al.*, 2009; Takada-Iwao *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2009; Lax, 2012).

Las cepas que poseen cápsula son más virulentas que las que carecen de ella, debido a que esta estructura permite la sobrevivencia de la bacteria hacia la fagocitosis (Harper *et al.*, 2006; Varga *et al.*, 2007).

Otras moléculas importantes en la virulencia de este microorganismos son; los lipopolisacáridos que son endotóxicos, las fimbrias y adhesinas importantes en la adhesión del organismo al hospedero. Las toxinas PMT, que son las causales de la rinitis atrófica, presentes en los serogrupos D, entre ellas DNT. Todos estos factores de virulencia permiten a este microorganismo colonizar al hospedero, evadiendo o destruyendo los sistemas de defensa de este, provocando serias lesiones en el tejido del animal (Harper *et al.*, 2006; Kamp *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012).

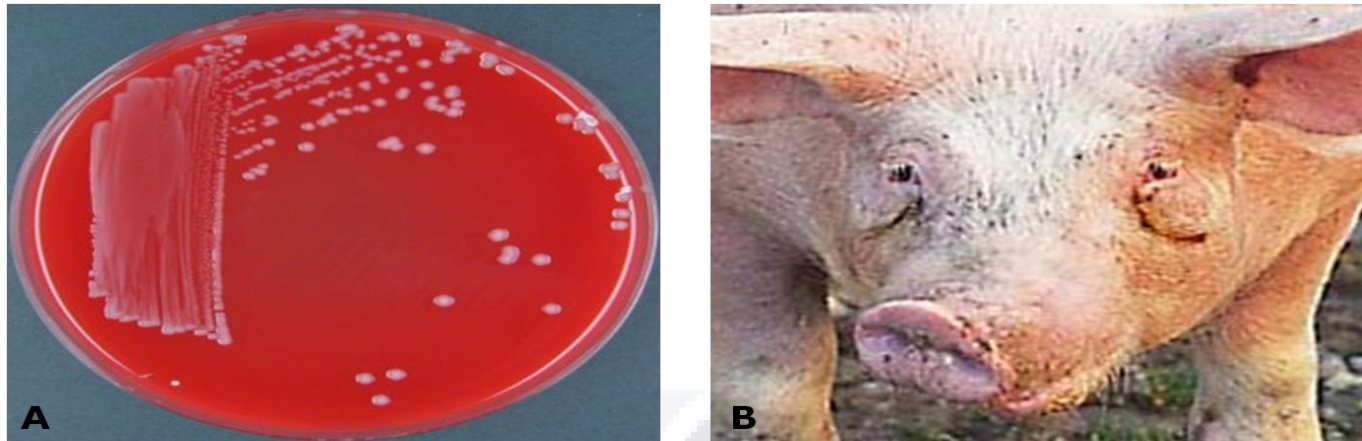


Fig. 9. *Pasteurella multocida* colonias en agar sangre y daño macroscópico provocado en el cerdo. **A)** Las colonias muestran tamaño mediano, consistencia mucosa y no son hemolíticas. **B)** Se muestra la desviación de la cavidad nasal asociada a la atrofia del tabique nasal producida por rinitis atrófica, así como lagrimeo y formación de estrías (Bavananthasivam *et al.*, 2012; Horiguchi 2012).

Bordetella bronchiseptica

B. bronchiseptica es un bacilo corto, Gram negativo, que se observa solo o en pares, aerobio estricto, capsulado, no forma esporas, móvil en ciertas condiciones, esta última característica la difiere de las otras especies de este género (**Fig. 10-A**). Reside principalmente en la cavidad nasal, asociada al epitelio ciliado (Bublitz *et al.*, 2009; Hozbor *et al.*, 1999; Irie, Y. & Yuk, M. H., 2007; Nicholson *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2012). Algunos de los factores de virulencia de este patógeno que le ayudan a colonizar al hospedero son adhesinas como la FHA involucrada en la formación de biopelículas, sistemas de secreción, en especial el tipo III, autotrasportadores, toxinas (regulados por el sistema de transducción de señales BvgAS) como la adenilato ciclasa hemolisina, la dermonecrotina, pertactina, además de flagelos que le permiten motilidad y la diferencian de las otras especies de *Bordetella* (codificados por los genes *fla*) (Bublitz *et al.*, 2009; Hozbor *et al.*, 1999; Molina-Gonzalez *et al.*, 2006; Nicholson *et al.*, 2011; Irie, Y. & Yuk, M. H., 2007; Jung *et al.*, 2012). Las especies pertenecientes al género *Bordetella*, causan enfermedades respiratorias en gran número de animales, al colonizar su tracto respiratorio. *B. pertussis* y *B. parapertussis* son patógenos humanos, que causan tos muy severa y alteraciones en el sistema respiratorio. *B. bronchiseptica*, que es la especie más promiscua de este género, es el agente etiológico de enfermedades respiratorias en gran número de animales como perros, aves, conejos, ratones, caballos, incluyendo al cerdo (Brockmeier *et al.*, 2008; Bublitz *et al.*, 2009; Burgos *et al.*,

2010; Koidl *et al.*, 2007; Winstanley *et al.*, 2000). Esta bacteria puede causar neumonía en lechones (**Fig. 10-B**), así como rinitis y bronquitis en cerdos maduros, rinitis atrófica, cuando se asocia con *P. multocida*, generando principalmente poca ganancia de peso en los animales, traduciéndose a grandes pérdidas económicas. (Brockmeier *et al.*, 2008; Nicholson *et al.*, 2011; Pósa *et al.*, 2011). *B. bronchiseptica* generalmente se encuentra como comensal o colonizador del tracto respiratorio en humanos, sin embargo se han observado casos de infección en humanos por esta bacteria. Las infecciones pueden ser contraídas por contacto con perros infectados (con traqueobronquitis). En humanos puede provocar endocarditis, peritonitis, meningitis, sepsis y bacteremia recurrente, generalmente en personas inmunocomprometidas (en especial con VIH) (Galeziok *et al.*, 2009; Molina-Gonzalez *et al.*, 2006; Ahuja *et al.*, 2012).

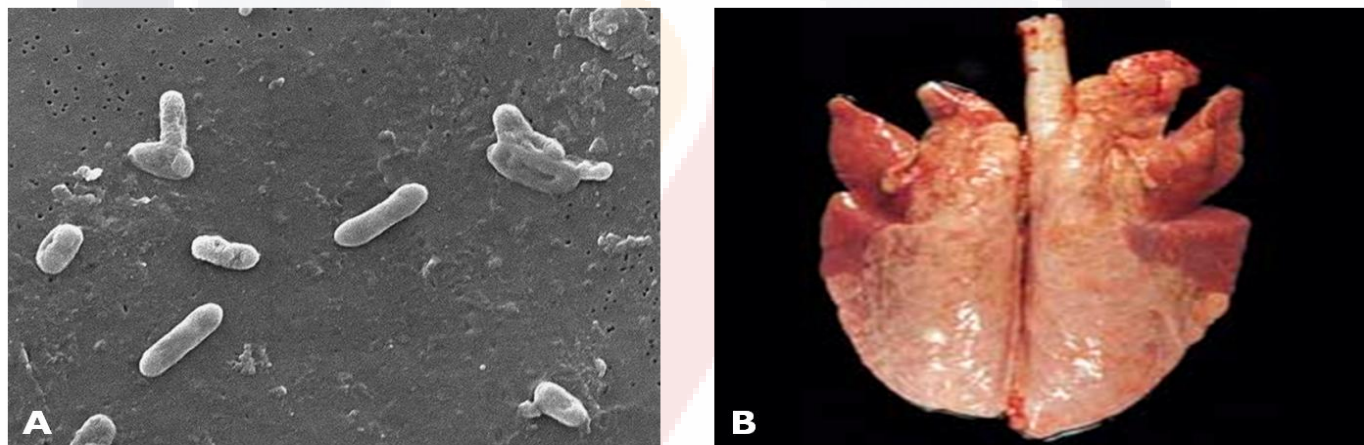


Fig. 10. *Bordetella bronchiseptica* micrografía electrónica de barrido y lesiones macroscópicas en los pulmones de cerdo. **A)** Microscopía electrónica de barrido (CDC; Public Health Image Library, 2009). **B)** Pulmón con bronconeumonía catarral purulenta por *Bordetella bronchiseptica* (Boehringer Ingelheim, 2010).

Haemophilus parasuis

Bacteria perteneciente a la familia Pasteurellaceae. Son bacilos cortos Gram negativos, con tendencia formar filamentos (**Fig. 11-A**), sin motilidad, no hemolíticos, no forman esporas, son anaerobios facultativos y requieren para su desarrollo factores de crecimiento como el factor X (hemina) o el factor V (dinucleótido nicotinamina, NAD) (Angen *et al.*, 2007; Del Río *et al.*, 2005; Mullins *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Mullins *et al.*, 2013). Es el agente etiológico de la enfermedad de Glässer, la cual se manifiesta con poliserositis, meningitis, artritis y septicemia. Otras manifestaciones clínicas

son neumonía aguda, fascitis, miocitis, formación de microtrombos provocando una diseminación de coágulos y muerte súbita (**Fig. 11-B**) (Zhao et al, 2013).

Las hembras que sobreviven a la infección son propensas a abortos (Aragon *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). Es común aislarlo del tracto respiratorio superior de animales sanos. Cuando infecta piaras de animales inmunocomprometidos puede causarles graves daños, siendo los lechones (de 4 a a 6 semanas) los organismos más afectados (Angen *et al.*, 2007; Aragón *et al.*, 2009; Zhao et al., 2013).

Casos de infecciones masivas se han reportado en países como Alemania, España, Australia, EUA, Japón y China, por tal motivo la infección de *H. parasuis* es considerada económicamente una de las enfermedades mas importantes del cerdo, debido al alto costo de los tratamientos y a la pérdida de animales (Chen *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2001). Poco se sabe acerca de los mecanismos de infección de este microorganismo. Se ha observado que los casos de enfermedad de Glässer, los lipopolisacáridos de membrana son de gran importancia en la adhesión de la bacteria a las células cerebrales del endotelio microvascular del huésped. Se ha visto también la participación de la cápsula de la membrana externa y proteínas formadoras de poros. Debido a estos factores se han descrito 15 serovariedades de *H. parasuis*, siendo la 1 y 5 las más virulentas, en cambio las serovariedades 2, 4, 6 y 7 se describen como las menos patógenas (del Río *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Mullins *et al.*, 2009; Frandoloso *et al.*, 2012; Mullins *et al.*, 2013).

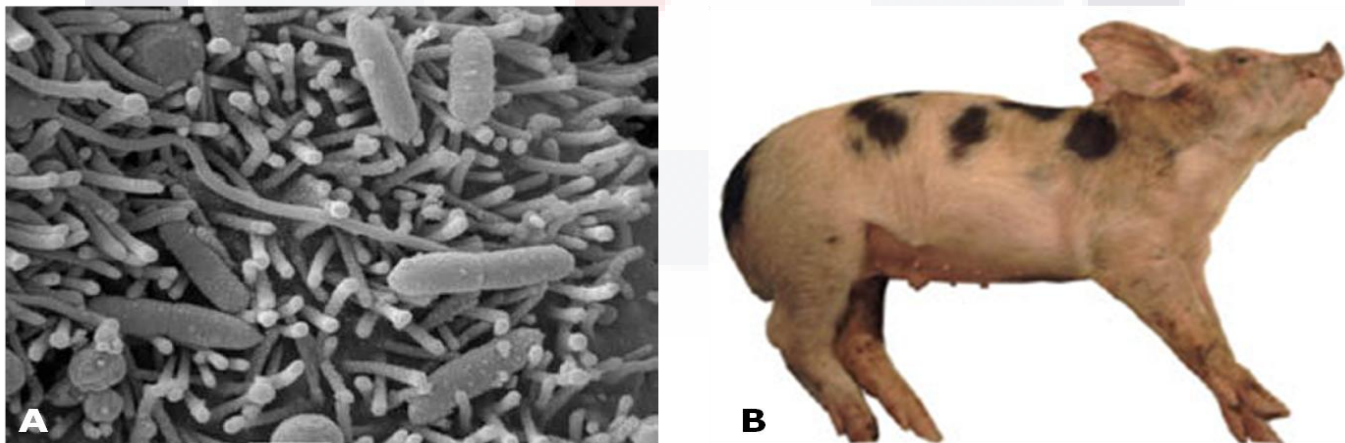


Fig. 11. Microscopía electrónica de barrido de *H.parasuis* y lesiones macroscópicas provocadas en el hospedero. **A)** Se muestran los filamentos que forma esta bacteria (Frandoloso *et al.*, 2012). **B)** Cerdo en decúbito lateral debido a síntomas nerviosos (nistagmo, extensión de las extremidades y opistótonos) en un caso de meningitis causada por *Haemophilus parasuis* (Aragón, 2008).

Mycoplasma hyopneumoniae

Los micoplasmas son las bacterias más pequeñas que se conocen (0.2 μ -0.8 μ). Pertenecen a la familia Mycoplasmataceae, Clase Mollicute y se caracterizan por carecer de pared celular o precursores químicos del peptidoglucano, presentando formas pleomórficas, con requerimientos nutricionales exigentes y con un genoma que puede ir de las 577 a 2200 kpb (**Fig. 12-A**). La familia Mycoplasmataceae requiere de colesterol para su crecimiento, algunos hidrolizan urea, oxidan ácidos grasos de cadenas cortas a través de la beta-oxidasa o degradan azúcares durante sus procesos glucolíticos. Comúnmente infectan animales causando enfermedades importantes (Rivera-Tapia et al., 2001). *Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente causal de la neumonía enzoótica, enfermedad con distribución mundial, la cual es una de las enfermedades más comunes e importantes económicamente en la industria de la producción del cerdo (Won et al., 2012). Se reportan pérdidas económicas en el orden de los 200 millones de dólares, debido a su mortalidad y alta morbilidad, además de incrementar la susceptibilidad del cerdo a patógenos como *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *P. multocida*, virus de la Influenza porcina, el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino y circovirus porcino tipo II (Cai et al., 2007; Fablet et al., 2009; Lobo E., 2005, Marois et al., 2009; Pinto et al., 2009; Redondo et al., 2009). Es uno de los agentes infecciosos más comunes asociados al PRCD.

Los síntomas principales de la neumonía enzoótica causada por *M. hyopneumoniae*, como tos seca y esporádica, lento crecimiento e ineficiente utilización de alimento en los animales, aparecen a los 16- 20 días después de la infección (Maes et al., 2008; Mayor et al., 2007; Marchioro et al., 2013). Esta enfermedad, se caracteriza por acúmulos de linfocitos en sitios perivasculares, peribronquiales y peribronquiolares, además de inflamación alveolar predominada por macrófagos, células plasmáticas y neutrófilos. Lesiones macroscópicas se observan en los pulmones y en diferentes partes del diafragma de color púrpura a gris (**Fig. 12-B**). Los daños provocados sobre las vías aéreas generalmente permiten la entrada infecciones secundarias, causadas por patógenos oportunistas, ya sea de tipo bacteriano, virales o parásitos (Calsamiglia et al., 1999; Drexler et al., 2010; Maes et al., 2008; Marois et al., 2009; Marchioro et al., 2013; DeBlanc et al., 2013). Se ha comprobado que algunas de las proteínas más importantes en la adhesión de este microorganismo al epitelio son las proteínas P97, P114 y P110, las cuales se comportan como citoadhesinas. Otras proteínas encontradas en este patógenos tienen actividad hemaglutinante y citotóxica. La vía de

entrada más común de este patógeno a la pira es mediante aerosoles y se puede encontrar fácilmente en muestras de la mucosa nasal o de la mucosa traqueal (Feng et al., 2009; Lobo, 2005; Maes et al., 2008; Nathues et al., 2012; DeBlanc et al., 2013).

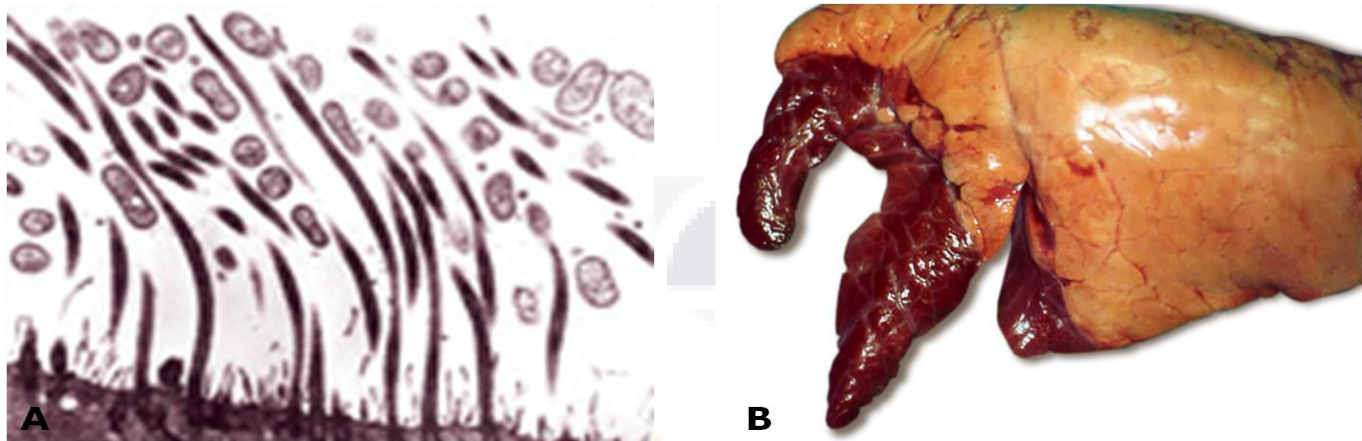


Fig. 12. *Mycoplasma hyopneumoniae* micrografía electrónica de transmisión y lesiones macroscópicas en el pulmón de cerdo. **A)** La micrografía muestra la bacteria adherida a células cilindricas epiteliales en un cerdo infectado (Bentley et al., 2005). **B)** Aspecto típico de las lesiones pulmonares de neumonía enzootica. Los lóbulos pulmonares antero-ventrales oscurecidos se encuentran consolidados por la infección (Thompson, 2010).

Coronavirus Porcino (PRCV)

Los coronavirus afectan a un gran número de especies de vertebrados, provocando enfermedades económicamente importantes en humanos, mascotas y animales de producción. Causan enfermedades respiratorias y entéricas en animales y humanos, como la tos común o el síndrome respiratorio agudo (SARS: por sus siglas en inglés) en humanos (Brockmeier et al., 2008; Zhong et al., 2012; Reguera et al., 2012). Estos virus presentan envoltura, de material genético de una sola cadena de ARN, en sentido positivo y un genoma excepcionalmente largo (por arriba de 31Kb). Son clasificados en tres grupos, Coronavirus caninos (CCoV), coronavirus felino (FCoVs) y virus transmisible de la gastroenteritis (TGE) (Chen et al., 2010; Kim et al., 2000; Zhong et al, 2012). El coronavirus porcino (PRCV), fue aislado por primera vez en Bélgica y Reino Unido en 1984, subsecuentemente fue aislado en otras partes del mundo como Norte América, Japón y Corea, siendo más contagioso el PRCV Europeo que el encontrado en América (**Fig. 13-A**). El PRCV pertenece a la familia *Coronaviridae* y al orden *Nidovirales* (Brockmeier et al., 2008; Jung et al., 2009; Usami et al., 2008; Wesley, R., 2002; Reguera et al., 2012). El PRCV es un mutante natural, debido a una

delección, del virus transmisible de la gastroenteritis (TGE), el cual es un coronavirus porcino entérico (**Fig. 13-B**). La delección en el gen de la espiga de la envoltura (Spike gene, codifica para ARNm3), ha alterado el tropismo de este virus de sistema entérico a sistema respiratorio, hacia las células epiteliales de la cavidad nasal, tráquea, tonsilas y pulmones (Brockmeier *et al.*, 2008; Chae *et al.*, 2000; Constantini *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 1998; Usami *et al.*, 2008). El PRCV presenta un genoma de 30 kb y produce de 7 a 8 ARNm subgenómicos virales durante su replicación en las células hospederas. Las tres proteínas principales son la proteína de la espiga (S), la proteína integral de la membrana (M) y la glicoproteína y la nucleocápside (N) (Constantini *et al.*, 2004; Nicholsson *et al.*, 2012). El TGE puede afectar tanto el sistema respiratorio como el sistema digestivo, siendo este último su blanco principal. Afecta la absorción de nutrientes, debido a la atrofia de las células intestinales, resultando en diarreas mortales en lechones, en cambio el PRCV solo causa enfermedades respiratorias leves o subclínicas en todo el tracto respiratorio, principalmente en los pulmones en donde infecta a los neumocitos tipo 1 y tipo 2 (Chae *et al.*, 2000; Constantini *et al.*, 2004; Wesley & Lager, 2003). Sin embargo, las infecciones con el PRCV y bacterias Gram negativas (por ejemplo *B. bronchiseptica*) resultan en enfermedades más severas, causando serios daños pulmonares como neumonías crónicas broncointersticiales, necrosis celular y neumonías proliferativas (tiene sinergismo con el lipopolisacárido de estas bacterias) (Chae *et al.*, 2000; Constantini *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2009; Van Gucht *et al.*, 2006).

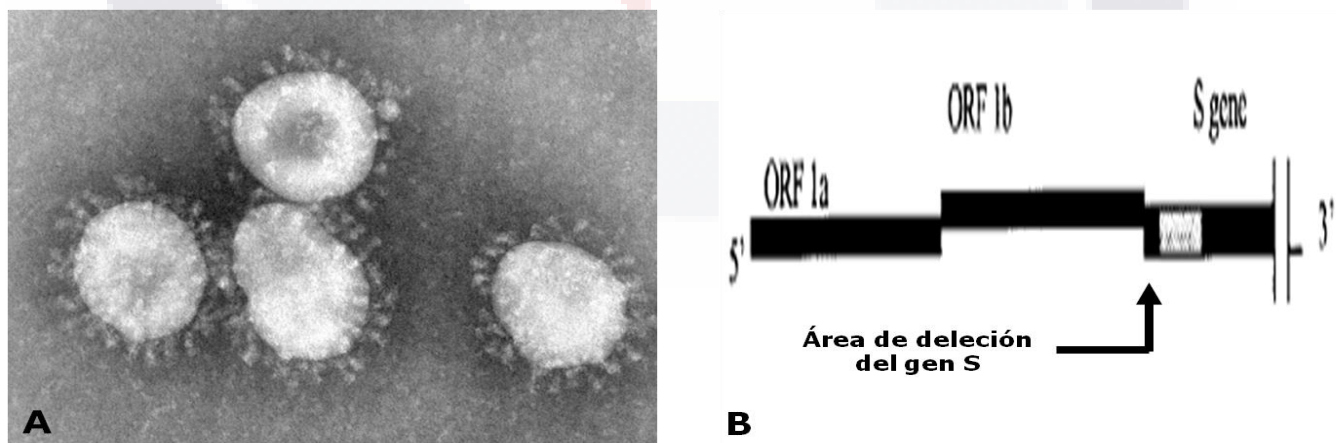


Fig. 13. Aspecto de los Coronavirus bajo microscopio electrónico de transmisión y esquema del genoma del TGE. **A)** Se muestra la nucleocápside con una gran nucleoproteína en forma de “corona” (espinas), que le da el nombre a estos virus (Hunt, 2009). **B)** Esquema del genoma del TGE donde se muestra la delección del gen S, del PRCV (Spike gen) (Kim *et al.*, 2000).

Circovirus Porcino (PCV)

Los Circovirus son los virus de ADN más pequeños que se conocen en la actualidad. Su genoma tiene un tamaño de entre 1760- 1770 nucleótidos, en una sola cadena circular en forma de anillo (de ahí su nombre de Circovirus), pertenecen al género *Circovirus* y a la familia *Circoviridae* (**Fig. 14-A**) (Jiang *et al.*, 2010; Karuppappan *et al.*, 2010; Vilcek *et al.*, 2010; Nicholsson *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2013; Changhoon *et al.*, 2013). Este genoma contiene por lo menos tres marcos de lectura abierta; ORF1, que codifica para las replicasas (proteínas de replicación del virus) Rep y Rep', ORF2 que codifica para la proteína de la nucleocápside (cap o NC) y ORF 3, la cual codifica para una proteína que no es esencial para la replicación pero que tiene actividad apoptótica (activación de las rutas de caspasas 3 y 8) y patogénica. Dos tipos de Circovirus se han identificado y caracterizado, el Circovirus porcino tipo 1 (PCV-1) y el Circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), del cual se reconocen actualmente tres genotipos (PCV-2a, 2b y 2c) (Hamel *et al.*, 2000; Cortey *et al.*, 2010; Gagnon *et al.*, 2007; Juhan *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2010; Karuppappan *et al.*, 2010; Vilcek *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2013).

El PCV-1, es un virus no patógeno, caso contrario el PCV-2 (Gagnon *et al.*, 2010; Juhan *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2012). El PCV-2 tiene un genoma de ADN circular de 1.76kb. Este virus es el patógeno más comúnmente asociado al síndrome de adelgazamiento post-destete (PMWS, por sus siglas en inglés) además de otras enfermedades como el síndrome de dermatitis y nefropatía porcino (PDNS), complejo respiratorio porcino (PRDC), enteritis granulomatosa y linfadenitis necrótica en animales en desarrollo y adultos. Se les denomina a estos síndromes en conjunto enfermedades asociadas a Circovirus porcino (PCVAD, por sus siglas en inglés) (Balint *et al.*, 2009; Gagnon *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2010; Rodríguez-Cariño *et al.*, 2010; Wellenberg *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2012).

El PDNS fue reconocido por primera vez en Canadá, en 1991, después de que brotes de este síndrome se identificaron en Francia, Italia y España. Actualmente este síndrome es reconocido como una enfermedad de gran importancia económica en muchos países del mundo (Balint *et al.*, 2009). Afecta principalmente a cerdos de 5 a 12 semanas de edad y se caracteriza por la pérdida de peso, disnea, ictericia, diarrea, engrosamiento de los nódulos linfáticos, degeneración o necrosis de los hepatocitos, neumonía linfocítica, además de abortos y fetos momificados (**Fig. 14-B**) (Gagnon *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2010; Pejsak *et al.*, 2009; Rodríguez- Cariño *et al.*, 2010; Alarcon *et al.*, 2013). Esta enfermedad puede

alcanzar valores de entre 5-50% de morbilidad en piaras infectadas y valores mortalidad de hasta 100% en cerdos que desarrollan todo los síntomas de esta enfermedad (Jiang *et al.*, 2010). Diversos factores contribuyen a la gravedad de este síndrome como la raza del cerdo, el sexo, el peso al nacer, además de otras infecciones (asociado a PRRSV o *Mycoplasma hyopneumoniae*). Este virus es común encontrarlo en macrófagos, monocitos y en una gran variedad de órganos con infiltrados inflamatorios. Se puede aislar de exudados nasales, orofaríngeos, sangre, suero, leche de hembras en lactancia y heces fecales (Hamel *et al.*, 2000; Balint *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2012; Alarcon *et al.*, 2013).

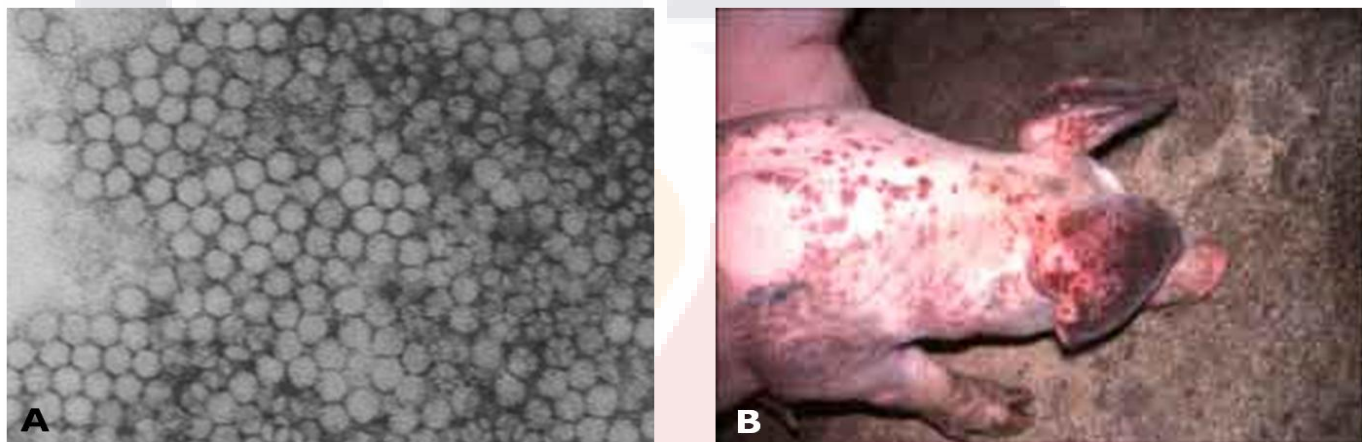


Fig. 14. Micrografía electrónica del PCV2 y lesiones macroscópicas provocadas en los animales infectados. **A)** PCV2, un virus sin envoltura, esférico, de simetría icosaédrica, tamaño pequeño 17 nm. Posee una molécula de ADN circular simple, en forma de anillo, de ahí su nombre, de 1,7 kpb (Arias *et al.*, 2009; Rodríguez- Cariño *et al.*, 2010). **B)** Animal con signos de PDNS. Obsérvese las lesiones en la piel color púrpura-rojo de forma irregular o circular (Chávez, 2010).

Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV)

Esta enfermedad es una de las más importantes para la industria porcina alrededor del mundo. Las pérdidas que provoca en E.U.A son de \$560- 664 millones de dólares anualmente (Hermann *et al.*, 2007; Moncada-Fernández *et al.*, 2006; Hu & Zhang, 2013, Arceo *et al.*, 2012). Apareció por primera vez en Estados Unidos en el año de 1987, años más tarde se registró también en Europa (Chen *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Greiser-Wilke *et al.*, 2009; Halbur *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2009; Changhoon *et al.*, 2013). El agente causal es el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV). Este virus pertenece a la familia *Artereviridae*, dentro del orden *Nidovirales*. Es un virus envuelto en una capa lipídica, con un genoma de ARN en sentido positivo, con una longitud de 14.5 Kb (**Fig. 15- A**). Estudios

filogenéticos han demostrado la existencia de dos principales genotipos, el Europeo (genotipo EU, tipo 1) y el Norte Americano (genotipo US, tipo 2), del cual derivan el PRRSV US clásico (C-US-PRRSV) y el altamente patógeno (H-US-PRRSV) (Chen *et al.*, 2009; Greiser-Wilke *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Wang and Christopher-Hennings, 2012; Morgan *et al.*, 2012). Las cepas Lelystad y VR-2332, son consideradas las cepas tipo para este virus (Lee *et al.*, 2010; Magar & Larochelle, 2004). Dentro de su genoma, los primeros marcos de lectura abierta (ORF1a y 1b) codifican para la polimerasa de este virus. ORF2, ORF3 y PRF 4, codifican para proteínas que no se sabe exactamente su función. ORF5, 6 y 7, codifican para la principal proteína estructural, de membrana, así como para la nucleocápside, respectivamente (Larochelle *et al.*, 2003, Mardassi *et al.*, 1995; Pirzadeh & Dea, 1998; Wang & Christopher-Hennings; 2012).

Este síndrome está caracterizado por fallas reproductivas en hembras, como abortos, lechones nacidos muertos (comúnmente momificados), además de lechones con bajo peso y débiles al nacer (**Fig. 15- B**). Alta mortalidad y morbilidad en las hembras gestantes. Causa también graves problemas respiratorios como neumonías en cerdos jóvenes y en animales en etapa final de crecimiento (Chen *et al.*, 2010; Larochelle *et al.*, 2003; Mardassi *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2009). Es difícil su control debido a su largo periodo de prevalencia en los cerdos (va de entre los 55 a 96 días), sumando su gran efectividad de transmisión por contacto directo entre cerdos infectados. Las vacunas que actualmente existen en contra de este virus no eliminan a este virus, sólo ayudan a minimizar las pérdidas económicas en las granjas (Greiser-Wilke *et al.*, 2009).

Su dispersión incluye vía aerosoles, carne infectada consumida por los animales, vía nasal, contacto directo entre animales, por excretas y orina infectada, vectores como moscas o mosquitos infectados, gran variedad de fómites contaminados, además de semen (ya sea de manera natural o por inseminación artificial) (Lawhorn, B., 2000; Moncada-Fernández *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2009). El virus preferentemente infecta células del linaje de los macrófagos y monocitos, en especial macrófagos alveolares del cerdo, a través de la endocitosis (las proteínas sialoadhesina y sulfato heparina, ayudan en este proceso) (Kim *et al.*, 2006; Wang and Christopher-Hennings, 2012).

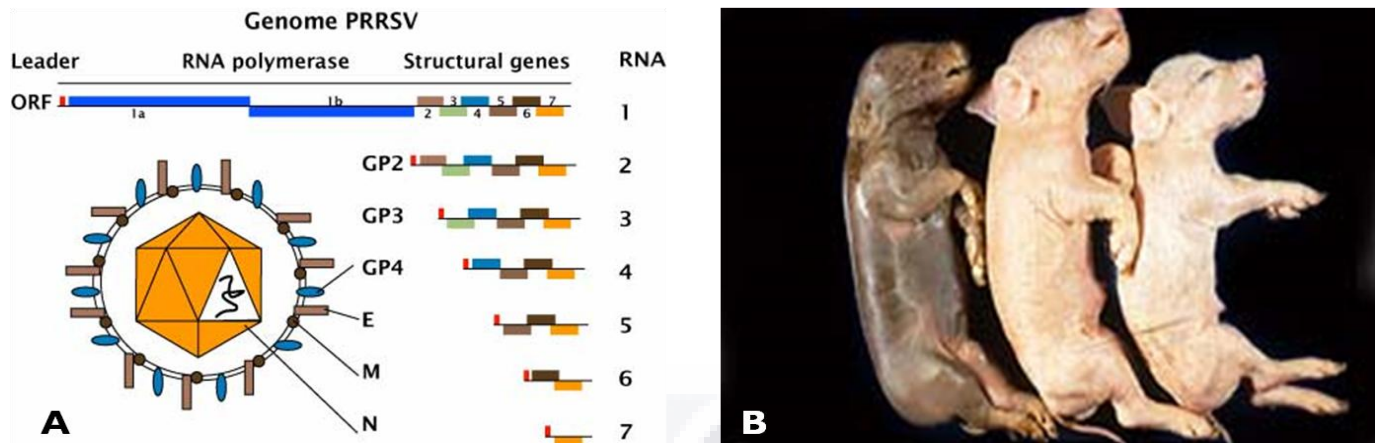


Fig. 15. Esquema del virus de la enfermedad respiratoria y reproductiva porcina (PRRSV, *Arterivirus*) y lesiones macroscópicas observadas productos abortados. **A)** El virus presenta una envoltura lipídica de 50-60nm y un genoma de ARN (Boehringer Ingelheim, 20010). **B)** Lechones abortados y nacidos muertos a causa de una infección con PRRSV, los lechones momificados son característicos (Arias et al., 2009).

Virus de la influenza porcina (SIV)

Las infecciones respiratorias en los cerdos debidas al virus de la influenza, comúnmente llamado gripe porcina, son comunes en países en vía de desarrollo (Choi et al., 2002; Jung et al., 2002; Yoon et al., 2004; Arunachalam et al., 2012; Perez et al., 2013).

Los virus de la influenza A (por ejemplo SIV), pertenecen a la familia de los Orthomyxoviridae, y el SIV al género de *Orthomyxovirus*. Estos virus presentan un genoma de 8 segmentos de ARN en sentido negativo. Estos segmentos codifican para 10 proteínas, incluyendo 3 transcriptasas (PB1, PB2 y PB), dos glicoproteínas de superficie (Hemaglutinina HA y Neuraminidasa NA), dos proteínas de matriz (M1 y M2), dos proteínas estructurales (NSP1 y NSP2) y una proteína de nucleocápside (NP), proteína con diferente antigenicidad y la cual genera tres tipos de influenza, los de tipo A, B y C (**Fig. 16-A**) (Jindal et al., 2009; Jung et al., 2002; Lee et al., 2008; Yoon et al., 2004; Yoneyama et al., 2009).

Las proteínas estructurales NSP1 y NSP2 (codificadas por el mismo gen) tienen como función la replicación del virus. La proteína de matriz M1 es el principal componente del virus y participa en el ensamblaje del virus, mientras que la proteína M2, participa de manera importante en el desacople del virus durante las fases iniciales de la infección. Ambas proteínas están codificadas por el mismo gen (Jindal et al., 2009; Jung et al., 2002). Finalmente, las glicoproteínas HA y NA, las cuales están presentes en la superficie del virus, le dan también variaciones antigénicas y así estas proteínas permiten la generación de diversos

subtipos de este virus. Así basados en las variaciones de los genes HA y NA existen 16 subtipos de HA (1 al 16) y 9 subtipos de NA (1 al 9) (Choi *et al.*, 2002; Jindal *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2006). Estos virus se han aislado de aves, su principal reservorio (de las 144 combinaciones posibles de HA-NA, 90 combinaciones se han encontrado en aves), además se han aislado de caballos (H3N8 y H7N7), de cerdos (H1N1, H1N2, H1N7, H2N3, H3N2 y N9N2), en focas, ballenas, minks y además de humanos (H1N1, H2N2 y H3N2) (Choi *et al.*, 2002; Jindal *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2006).

El genoma segmentado del SIV permite una recombinación genética cuando dos o más virus co-infectan a una misma célula, haciendo de este virus un organismo zoonótico, así muchos de los virus de influenza porcina que circulan en la actualidad están compuestos de genes de origen humano o/y aviar (Karasin *et al.*, 2006; Lalle *et al.*, 2010; Mahony *et al.*, 2009; Rumschlag-Booms & Rong, 2013). Como se mencionó anteriormente, existen actualmente tres subtipos principales de virus de la influenza porcina, los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 (existe una variante H3N1, aislada en EUA). El subtipo H1N1 fue el primero en aislarse.

En Estados Unidos, Francia y Japón (1999, 1987 y 1978 respectivamente) se aisló después el subtipo H1N2. A la postre en diversas partes del globo se aisló el subtipo H3N2 (**Fig. 16-B**) (Lee *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2006).

Las infecciones por este virus (cualquiera de los tres subtipos) en las piaras de cerdos son manifestadas comúnmente como brotes explosivos de infecciones respiratorias agudas, con fiebre alta, anorexia, pérdida de peso, letargia, escurrimientos nasales u oculares, tos y disnea.

Alta morbilidad y una mortalidad entre 5% son comunes en este tipo de brotes. La gravedad de cada uno de los síntomas dependerá del subtipo que infecte a la piara (Jung *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2002). El alto potencial que tiene este virus de ser un patógeno zoonótico, hace de gran importancia su identificación rápida y precisa en los cerdos (Rumschlag-Booms & Rong, 2013).

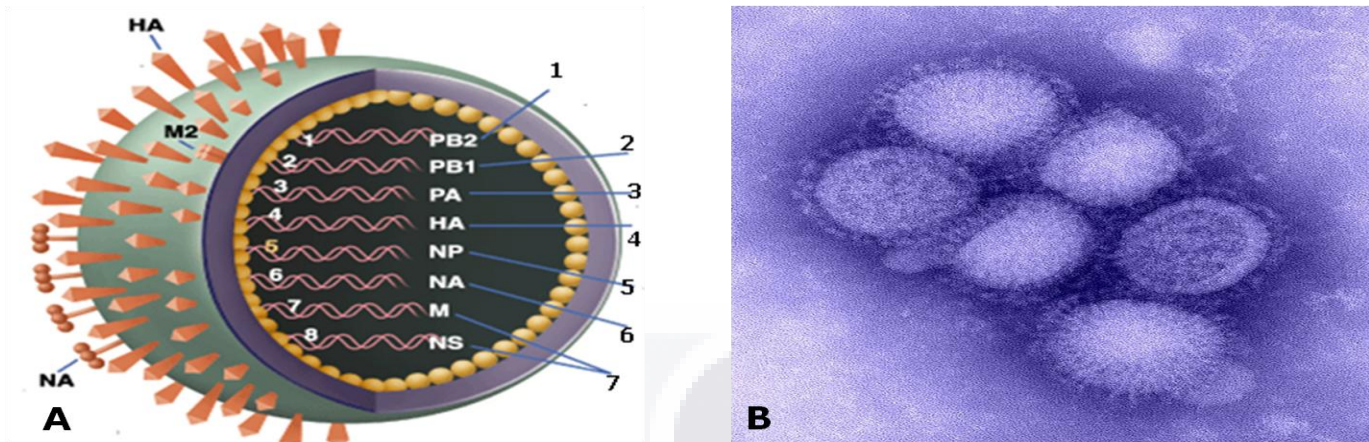
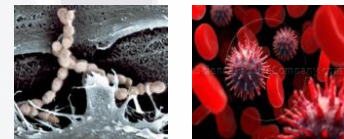


Fig. 16. Esquema representativo del Virus de la influenza y microscopía electrónica de transmisión del virus de la influenza porcina. **A)** Imagen representativa del virus de la Influenza. Se muestran los diferentes orígenes de las enzimas polimerasas que hay en cada subtipo. 1- Aviar, 2- Aviar o humana, 3- Aviar, 4- Humana o porcina, 5- Porcina, 6- Humana o porcina y 7- Porcina. NA, Neuraminidasa, HA, Hematoglutinina (Reuters, 2010). **B)** micrografía electrónica de transmisión del Virus de la influenza porcina (Reuters, 2010).

2.5. Identificación microbiana y pruebas bioquímicas



Debido a la gran incidencia de enfermedades respiratorias en el mundo, es importante identificar los agentes causales para poder prevenirlas o controlarlas. Estudios previos realizados en rastros y granjas del Estado de Aguascalientes indican una prevalencia de enfermedades respiratorias que supera el 40% (Bautista-Villalpando, 2009; Cornejo-Amador, 2007; Morfín-Mata, 2009; Prieto-Macías, 2007). Debido a lo anterior se propone el presente estudio para identificar los patógenos presentes en 12 granjas porcícolas del Estado de Aguascalientes. En la actualidad existen diversos métodos para la identificación de patógenos de diversos orígenes. A continuación se describen brevemente algunas de las más usadas.

La identificación microbiana se realiza tomando en cuenta sus características fenotípicas como morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos. En el cultivo es esencial la correcta

elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación. Las pruebas bioquímicas se basan en el metabolismo microbiano, el cual puede ser específico y característico de cada especie. Se determina la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se adiciona en un medio de cultivo y que el microorganismo al crecer incorpora, modifica o utiliza dando reacciones características (Ingraham & Ingraham, 1998).

Inmunoserología. Mediante el ensayo inmunoabsorbente enzimático (ELISA: por sus siglas en inglés “Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”), es posible identificar anticuerpos circulantes específicos para antígenos de microorganismos particulares y de esta manera detectar la infección (Chege *et al.*, 2008). Este sistema genera resultados en cuestión de horas y con sensibilidades que oscilan del 90 al 95% y especificidades que van del 85% al 92%, dependiendo del antígeno empleado. Posee las ventajas adicionales de evaluar la respuesta inmune ante la infección bacteriana, es decir; discernir cuando se presentan bacterias vivas y muertas en el huésped, es fácil de estandarizar y necesita menos reactivos y equipamiento que otros sistemas (Zenteno, 2003). Esta técnica ofrece el mayor potencial para la realización de pruebas serológicas rápidas y puede ser de gran valor cuando sea difícil obtener muestras clínicas. Sin embargo, la técnica de ELISA tiene la desventaja de presentar variaciones dependiendo del antígeno empleado, arroja falsos positivos por mal manejo de reactivos o contaminación de la muestra, se necesita personal altamente capacitado y equipo especializado para la lectura de las muestras (Zenteno 2003).

Inmunocitoquímica indirecta. Técnica de inmunotinción que permite demostrar una variedad de antígenos presentes en las células utilizando un anticuerpo primario dirigido específicamente al patógeno en cuestión y un anticuerpo secundario unido a un marcador fluorescente. Ésta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. En las técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta se utilizan como marcadores compuestos fluorescentes que bajo luz ultravioleta emiten luz de longitud de onda visible, que depende de la naturaleza del fluorocromo. La diferencia con la técnica de inmunofluorescencia directa es que el anticuerpo primario no se encuentra acoplado a un fluorocromo.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Técnica desarrollada por Kary Mullins en 1985. Esta técnica se basa en que la información biológica de todos los organismos se

almacena en moléculas de ADN o ARN, ácidos nucleicos compuestos por nucleótidos ordenados en secuencias repetidas de tres nucleótidos. Cada nucleótido se forma por una pentosa, ribosa en el RNA o 2-desoxirribosa en el DNA, un grupo fosfato (mono, di o trifosfato) y una base púrica (adenina o guanina) o pirimídica (citosina, timina o uracilo) (Lodish H., 2005). Existen secuencias de ácidos nucleicos exclusivas de diferentes organismos, que permiten identificarlos entre otras secuencias existentes de material genético en una muestra compleja (O'Connor, 2006). PCR es un proceso *in Vitro*, que permite la generación de millones de copias (amplificación) de ADN de una región específica contenida en otra molécula de ADN (molde), como puede ser el genoma de un organismo. La reacción de PCR es llevada por el uso de oligonucleótidos de secuencia ya sea aleatoria o específica. Estas moléculas de ADN son cortas de cadena sencilla que se hibridan a la molécula molde y así limitan y definen la región que se amplificará. Durante la reacción de PCR se sintetiza ADN, mediante la enzima ADN polimerasa, únicamente en el lugar donde se unieron los oligonucleótidos (Elizondo-Barron *et al.*, 2004; Medina-Figueroa *et al.*, 2010).

Este método es basado en la reacción en cadena, es decir que son varios ciclos de polimerización los que se deben de emplear (**Fig. 17**). Al inicio de la reacción, la cadena de ADN molde tiene que separarse para que los oligonucleótidos puedan hibridarse en ella y comenzar la polimerización y con ello generación de múltiples copias. Así las cadenas generadas en ciclos previos servirán de molde para posteriores ciclos y con ello se generaran múltiples copias del fragmento deseado. Para cada ciclo de reacción se describe brevemente los pasos que se emplean (Elizondo-Barron *et al.*, 2004; Lodish, 2005, Medina-Figueroa *et al.*, 2010).

Desnaturalización del ADN. El ADN de doble cadena se convierte en ADN de cadena sencilla y por ello se vuelve accesible a la unión de los oligonucleótidos. Este ciclo se lleva a cabo a una temperatura de 95°C.

Alineamiento. En esta etapa los oligonucleótidos se hibridan a sus regiones complementarias de la cadena molde. Para esta etapa la temperatura varía desde los 30°C hasta los 60°C, según sea la región homóloga. Entre mayor sea la región homóloga se necesita una mayor temperatura de alineamiento.

Extensión. Etapa final de cada ciclo. Aquí, la ADN polimerasa reconoce el extremo OH 3' libre del oligonucleótido y adiciona los desoxirribonucleótidos generando la cadena de ADN complementaria. Esta fase se realiza a 72°C (Elizondo-Barron *et al.*, 2004; Lodish, 2005).

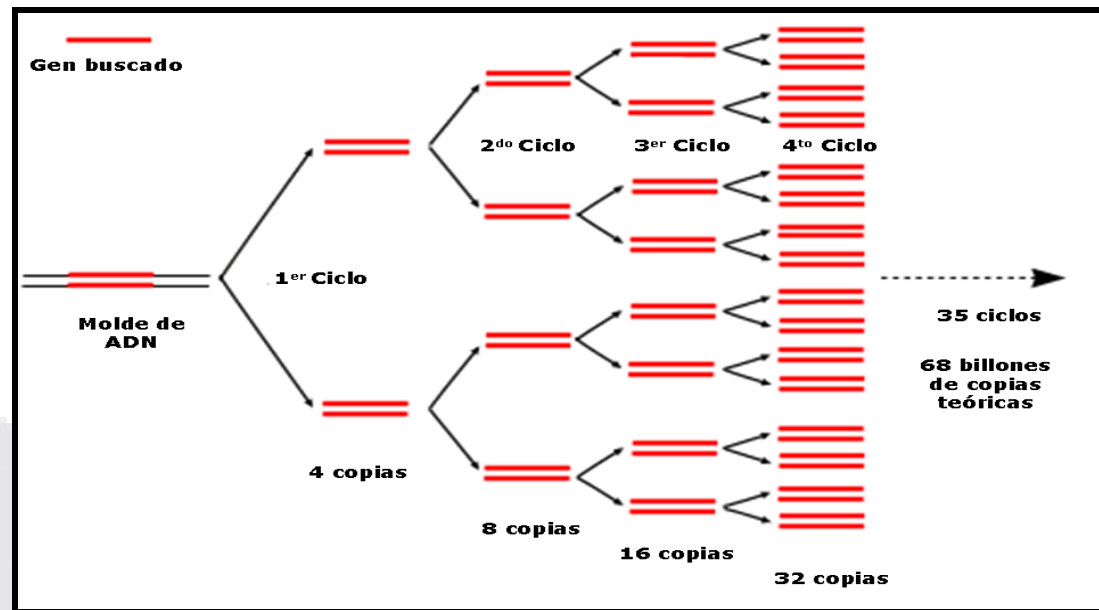


Fig. 17. Etapas del proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por cada ciclo ocurre una desnaturalización, alineación y una etapa de extensión (basado en Lodish, 2005).

Hibridación *in situ*. La hibridación *in situ* es una técnica que permite detectar secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos preservados. La detección *in situ* provee una visualización directa de la localización espacial de secuencias específicas y es una herramienta muy útil para el diagnóstico. La hibridación *in situ* toma como fundamento la complementariedad de los ácidos nucleicos, la cual puede ser DNA y/o RNA, a través de puentes de hidrógeno formados entre las bases: adenina-timina (DNA) o uracilo (RNA) y citosina-guanina (DNA y RNA). Este apareamiento da lugar a una doble cadena en la cual una cadena, tiene la orientación opuesta a la otra con respecto al esqueleto azúcar-fosfato. La secuencia es leída de 5' a 3'. Para detectar específicamente un marcador molecular la sonda empleada es acoplada a un fluorocromo (IBT-UNAM, 2008).

Como se ha expuesto anteriormente, existen diversas técnicas para la identificación de los patógenos, la selección de alguna de ellas depende de la especificidad y la sensibilidad de la técnica, así como la complementariedad de los resultados obtenidos. Por lo anterior, se seleccionaron técnicas como la caracterización microbiológica y pruebas bioquímicas, complementadas con la inmunotinción indirecta, la reacción en cadena de la polimerasa y la hibridación *in situ*.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS



3- JUSTIFICACIÓN

Estudios realizados previamente en rastros y granjas del Estado de Aguascalientes, indican una prevalencia de enfermedades respiratorias que supera el 40% detectadas a lo largo del año. Debido a lo anterior, así como a la posibilidad de que el ambiente tenga una contribución importante en la preservación y dispersión de patógenos respiratorios. El presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar si los agentes infecciosos respiratorios del cerdo, persisten en el ambiente circundante a los animales en las granjas porcícolas del estado. Así, se exploró en muestras de agua, alimento, suelo, orina y excretas la presencia de estos patógenos. Como un control interno de la presencia de patógenos respiratorios en los animales de la granja se analizaron muestras de exudado nasal. Como método de detección inicial de estos patógenos se usó el análisis por PCR, seleccionando oligonucleótidos específicos para cada patógeno bajo estudio. Se eligieron patógenos respiratorios virales primarios como el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, el virus de la influenza porcina y el circovirus tipo 2. Como patógenos respiratorios bacterianos primarios se seleccionaron a *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Como patógenos oportunistas se exploró la presencia del coronavirus porcino, *Pasteurella multocida*, *Hemophilus parasuis* y *Streptococcus suis*. Además a través del uso de pruebas de viabilidad y medios de cultivo específicos se evaluó la viabilidad de los patógenos bacterianos identificados mediante PCR y encontrados en el medio de las 17 granjas involucradas. Para corroborar la presencia de *A. pleuropneumoniae* se usó técnica de inmunotinción indirecta con anticuerpos policlonales específicos dirigidos contra las proteínas totales de la bacteria. En otros casos se usó la hibridación in situ fluorescente. De esta forma se probó la importancia del ambiente circundante como reservorio y posible vía de dispersión de las enfermedades respiratorias.

4- HIPÓTESIS

Los patógenos respiratorios porcinos bacterianos y virales se encuentran en el ambiente que rodea al cerdo en las granjas porcícolas de Aguascalientes tal como agua de consumo, alimento, excretas, orina, suelo y aire, a través de estos elementos se realiza la transmisión de patógenos respiratorios en las piaras.





OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la presencia de patógenos porcinos respiratorios en los animales y en el ambiente de las 17 granjas porcícolas distribuídas en el Estado de Aguascalientes y proponer métodos de manejo de residuos orgánicos en las granjas porcícolas, como sistemas de prevención de la presencia de los agentes infecciosos.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la presencia de bacterias patógenas porcinas respiratorias primarias (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*) y patógenos bacterianos oportunistas (*Pasteurella multocida*, *Hemophilus parasuis* y *Streptococcus suis*), en exudado nasal de los animales y en el ambiente de las granjas porcícolas, provenientes de medio de cultivo y de muestras directas del ambiente, usando análisis por PCR y RT-PCR.
- Evaluar la presencia de agentes infecciosos respiratorios porcinos virales primarios (Virus del síndrome porcino respiratorio y reproductor, virus de la influenza porcina y circovirus tipo 2) y agentes virales oportunistas (coronavirus porcino) en el exudado nasal de los animales y en el ambiente de las granjas porcícolas, usando análisis por PCR y RT-PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS



6.1 Diseño general del proyecto



El proyecto se dividió en tres vertientes principales todas partiendo de la toma de exudado nasal, orina y muestras ambientales en 17 granjas porcícolas del estado de Aguascalientes, como se muestra en el figura 18. Después de la toma de muestras, cada una se sembró en medios de cultivo bacteriológicos específicos. Posterior a la incubación, se llevó a cabo la extracción de ADN para la identificación de patógenos de origen bacteriano mediante PCR. Por otro lado, las muestras también fueron tratadas directamente para la extracción de ADN y de ARN. Finalmente, se llevó a cabo la identificación de patógenos de origen viral como de origen bacteriano mediante las técnicas de RT-PCR y PCR respectivamente. A partir de las muestras de agua de consumo provenientes de las 17 granjas porcícolas, determinó la presencia de *A. pleuropneumoniae*. Primero se aisló en agar sangre en presencia de la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, seleccionando las cepas con prueba de CAM positiva. Posteriormente las cepas aisladas fueron identificadas a través de la técnica de tiras Api NE (Biomérieux). Para corroborar la identidad de las cepas obtenidas e identificadas como *A. pleuropneumoniae* se realizó inmunotinción indirecta. La viabilidad de las cepas identificadas se realizó mediante su cultivo en BHI-NAD (15µg/ml) y empleando el kit de viabilidad para bacterias Dead Live/Bactlight (Molecular Probes). Además se determinó la presencia de biopelículas en el agua de consumo mediante las técnicas de Hibridación *in situ*, FISH, inmunotinción específica y microscopía electrónica de barrido (MEB).

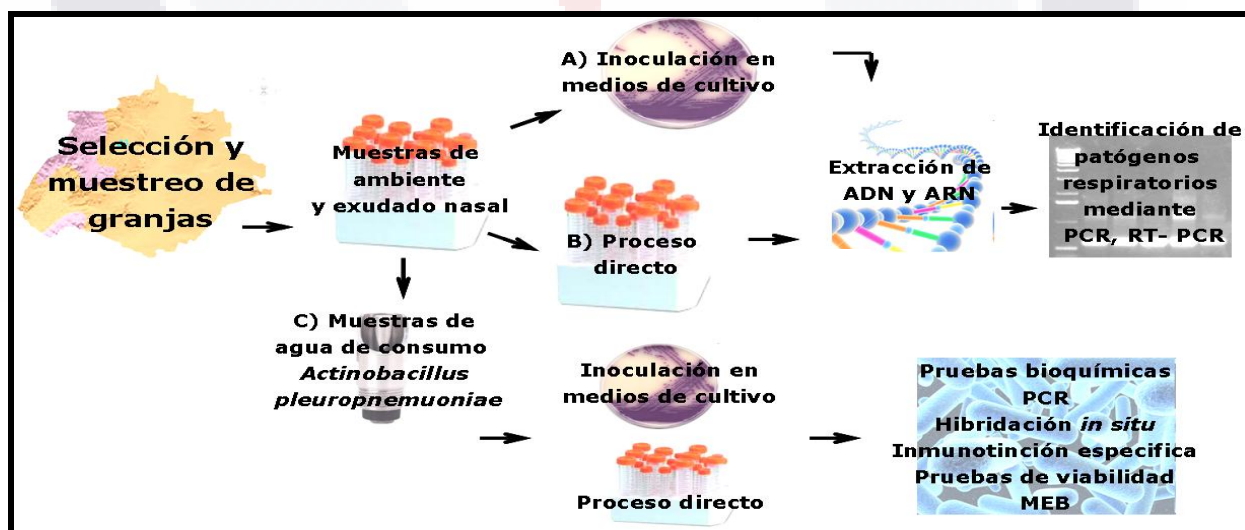


Fig. 18. Resumen general de la organización del proyecto.

6.2 Selección de granjas y toma de muestra



El estudio se realizó en 17 granjas porcícolas del Estado de Aguascalientes, México, seleccionadas conjuntamente con la Asociación Ganadera Local de Porcicultores del Estado de Aguascalientes (AGLPEA) (**Fig. 19**).

No se observaron signos clínicos de ninguna enfermedad respiratoria en los animales muestreados. Se realizó un muestreo aleatorio y compuesto, de una manera distribuida en cada granja, según lo indica Daniel (1997) y Cochran (1977). Se tomaron las muestras ambientales de manera aleatoria en cada granja y se mezclaron para formar una sola muestra de 4 diferentes puntos (muestra compuesta) con el fin de abarcar más espacio de muestreo. Las muestras de agua estaban compuestas de 10 ml por cada punto (muestra compuesta= 40ml), las muestras de suelo y alimento de consumo, estaban compuestas de 10gr por punto (muestra compuesta= 40gr) (anexos).

Esta estrategia de muestreo se implementó para aumentar la probabilidad de detectar los patógenos respiratorios y mantener un número manejable de muestras. El número de muestras obtenidas por granja fue de 5-10 o 11-20 para granjas con 100-1000 animales o 1000-3000 animales respectivamente. Se tomaron muestras de exudado nasal y de ambiente tales como orina, suelo, aire, agua y alimento de consumo.

Las muestras de exudado nasal fueron tomadas de cerdos que variaron en peso, edad, raza, estado de salud y caseta. Las muestras se depositaron directamente en tubos estériles correctamente rotulados (tipo de muestra, número de muestra, granja y fecha de muestreo) después de su colecta hasta su procesamiento. En la figura 29 se muestra la ubicación de las granjas involucradas en el estudio.

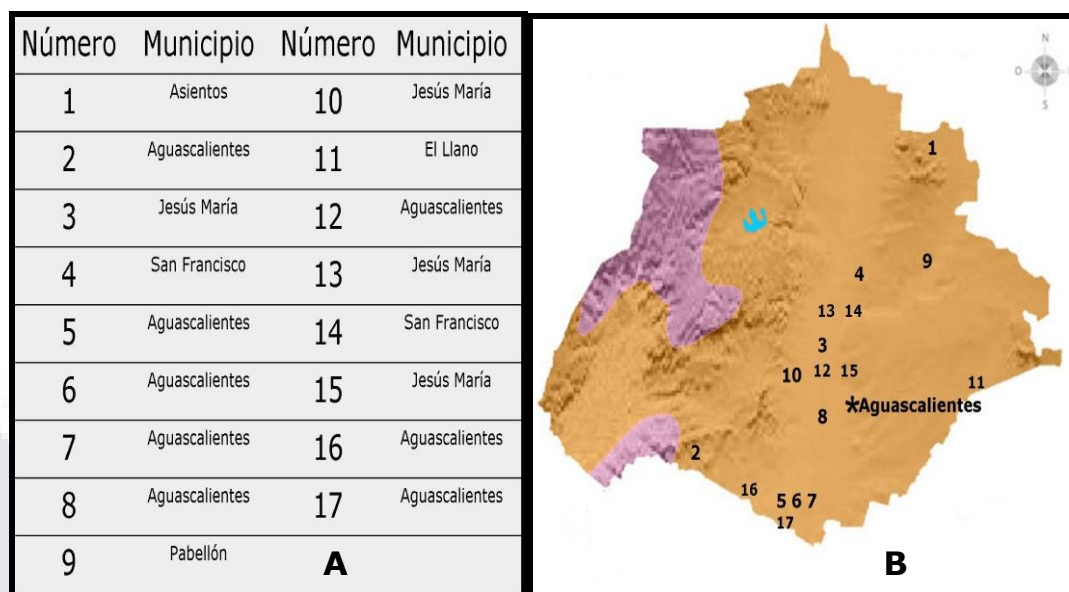


Fig. 19. Distribución de las granjas muestreadas en el presente estudio. A) Granjas muestreadas en este trabajo y el municipio que pertenecen y B) Distribución de las granjas en el estado de Aguascalientes. ■ Clima semiseco, ■ Clima Templado- subhúmedo (INEGI 2005).

6.3 Procesamiento de las muestras



Después de obtener la muestra ambiental, esta se procesó de dos maneras distintas, inoculación en medios de cultivos y proceso directo.

Cultivo bacteriano en medios específicos. Para verificar la viabilidad de los patógenos encontrados en el medio que circunda al cerdo se realizó la inoculación de las muestras en medios específicos. Para el caso de las muestras de alimento y suelo, se tomaron 5 g de muestra y se disolvieron en 10 ml de PBS (1X), posteriormente se inocularon 10 µl en agar BHI+NAD (15mg/ml), agar sangre (5 ml de sangre/ 100 ml) (Bioxon, México). Para las muestras de exudado nasal, el hisopo se disolvió directamente en 10 ml de PBS (1M) y posteriormente 10 µl de la muestra fue inoculada en los medios de cultivo antes mencionados. Para el caso de *M. hyopneumoniae*, las muestras de exudado nasal se disolvieron en PBS (1X) y se inocularon 10 µl de la muestra en agar micoplasma (Difco, TM) enriquecido con sangre y extracto de levadura (Bioxon). EN el caso de las muestras de agua y de orina, las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm (Universal 320R, Hettich) para concentrar a las bacterias. El 80% del sobrenadante fue descartado y la pastilla se

resuspendió en el sobrenadante remanente. Después un volumen de 10 µl fue inoculado en los medios de cultivos previamente descritos. Las muestras de aire fueron incubadas directamente. Todas las muestras se incubaron por 24-48 horas a una temperatura de 37°C y 5% CO². La incubación de las muestras en agar para Micoplasma fue de 9 días a 37°C (BD, 2009; Kiorpes *et al*, 1990; Williams *et al.*, 2000). Posteriormente se extrajo el ADN a cada cultivo bacteriológico (**Fig. 20-A**).

Procesamiento directo. Para el segundo procesamiento, la extracción de ADN y ARN de las muestras ambientales se realizó directamente (**Fig. 20- B**).

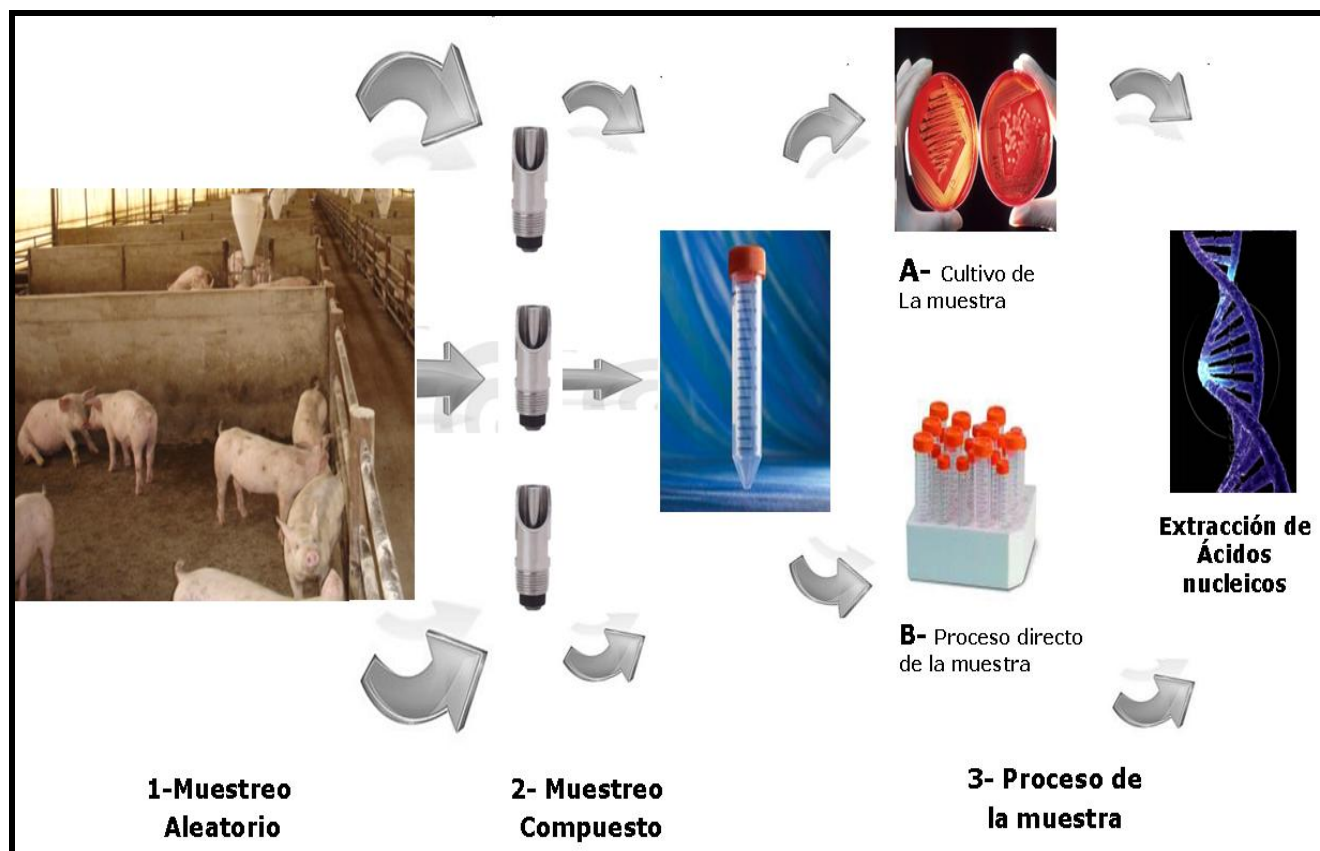


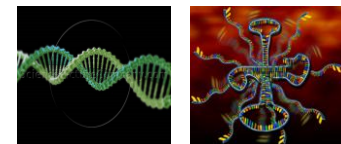
Fig. 20. Diagrama de flujo del muestreo realizado en las granjas porcinas bajo estudio. 1) La selección de los puntos de muestreo fue al azar. 2) Cada muestra analizada fue compuesta de 4 puntos para cada tipo de muestra (la figura ejemplifica la toma de agua). 3) Se siguieron dos metodologías para el proceso inicial de la muestra (A y B). Finalmente, se realizó la extracción de ácidos nucleicos de cada muestra, para su análisis mediante PCR (Cochran, 1977; Daniel, 1997).

Cepa de Referencia	Medio empleado para su crecimiento	Incubación
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotipo 1 S-4074	BHI+ NAD (15µg/ml)	24-48 hrs, 37°C
<i>Hamophilus parasuis</i> serotipo 5 (Nagasaki)	BHI+ NAD (15µg/ml)	24-48 hrs, 37°C
<i>Streptococcus suis</i> serotipo 2 (735)	BHI o Agar sangre	24-48 hrs, 37°C
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> ATCC	Micoplasma Base	9 días, 37°C
<i>Pasteurella multocida</i> serotipo 4 S-4056 (tipoD, DNT+)	BHI+ NAD (15µg/ml)	24-48 hrs, 37°C
<i>Bordetella bronchiseptica</i> 274	BHI+ NAD (15µg/ml)	24-48 hrs, 37°C

Tabla 1. Cepas de referencia usadas como controles positivos para las pruebas diagnosticas de PCR. Las cepas fueron donadas por El Grupo de Investigación en Enfermedades Respiratorias del Cerdo (GREMIP) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Montreal, Canadá. Medio BHI Bioxon, Medio Mycoplasma base Difco. Los medios fueron preparados de acuerdo con las indicaciones de uso de cada casa comercial.

Por otra parte las cepas de referencia usadas como controles positivos fueron sembradas en los mismos medios bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente (**tabla 1**).

6.4 Extracción de ácidos nucleicos



6.4.1. Extracción de ADN

Para la obtención de ADN de las muestras provenientes del ambiente de las granjas porcícolas y del exudado nasal y las cepas de referencia, se siguió el método de Sambrook y Russell (2001), con algunas modificaciones. A las muestras inoculadas en medio de cultivo se añadió, directamente en la placa microbiológica 3 ml de Buffer de lisis, (15% de Sacarosa, lisozima (0.3 mg/ml USB Corporation), EDTA 0.05M y Tris 1M, pH 8) se resuspendió la muestra y se paso 1ml a tubo Eppendorf. Para las muestras directas, se tomo 1 g de cada muestra y se le añadió 3 ml de Buffer de lisis, se mezcló vigorosamente y se paso 1ml a tubo Eppendorf.

Para las muestras de agua y orina, primero se centrifugaron por 15 minutos a 10000 rpm (Universal 320R, Hettich). El sobrenadante fue descartado y la pastilla obtenida fue

resuspendida en 1 ml de Buffer de lisis. Después a esto a todas las muestras se les procesó de igual manera. La mezcla anterior se incubó por 30 minutos a 37°C. Posterior a la incubación se le añadió SDS 10% (0.1 v/v), NaCl 5M (0.1 v/v) y Proteinasa K (0.4 mg/ ml; USB Corporation). Esta mezcla se agitó y se incubó por periodo de 1h a 50°C. Después la muestra fue centrifugada a 1000 X g por 15 min. Se tomaron 500 µl del sobrenadante y se le añadieron 200 µl de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:24:1, Gibco BRL).

La mezcla fue agitada con Vortex (Fisher) y se centrifugó por 5 min a 12000 X g. Después el sobrenadante fue recuperado y se le añadió 150 µl de Acetato de Amonio (7.5 M) y etanol absoluto (2V). Se agitó por inversión por 5 minutos y se dejó precipitar toda la noche a 4°C. Después, la mezcla fue centrifugada a 4°C, por 15 minutos a 12000 X g. El sobrenadante fue desechado y la pastilla se lavó varias veces con etanol (70%). Las muestras fueron secadas al temperatura ambiente y el ADN fue almacenado a 4°C hasta su uso.

6.4.2. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó Trizol (Gibco BRL®, 2007). Se colocó la muestra en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le agregó 1 ml de Trizol Reagent (Gibco BRL). Posteriormente se homogeneizó la muestra vigorosamente 15 segundos y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió 200 µl de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se centrifugó 12000 X g/ 15 minutos a 4 °C. Se recuperó fase acuosa a tubo limpio (alrededor de 200 µl). Se añadieron 50 µl de cloruro de litio (LiCl) a una concentración final de 3 M. Después se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto (aproximadamente 500 µl) y se incubó por 30 minutos a -20 °C. Después se centrifugó a 12 000 X g durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en H₂O (20 µL).

Se analizó la calidad de ARN obtenido mediante un sistema de electroforesis horizontal en geles de agarosa de electroforesis horizontal (*Bio Rad*) usando geles de agarosa a diferentes concentraciones según el tamaño del fragmento esperado. El voltaje usado fue 80V. Las bandas de ADN amplificado fueron observadas bajo luz UV y capturadas con el sistema analizador de imágenes ChemiDoc *Bio Rad* (Quantity one 4.4 Basic) (Sambrook y Russell, 2001).

Cepa de referencia	Material Genético
Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (PRRSV).	ARN
Virus de la Influenza Porcina (SIV)	ARN
Coronavirus Porcino (PRCV)	ARN
Circovirus Porcino tipo 2 (PCV2)	ADN

Tabla 2. Cepas de referencia usadas como controles positivos para las pruebas diagnosticas de PCR, RT-PCR. El material genético de las cepas fue donado por El Centro de Investigación en Infectología Porcina (CRIP, por sus siglas en francés: Centre de Reserche en Infectiologie Porcine) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Montreal, Canadá.

6.5 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)



Para la identificación de los patógenos respiratorios de cerdo en muestras de ambiente y muestras nasales, provenientes de granjas porcícolas se utilizo la técnica de PCR y de RT-PCR. Teniendo el material genético extraído tanto ADN como ARN, se continuó con el empleo del PCR. Para asegurar que la composición heterogenea de las muestras de ambiente y exudado nasal no interfirieran con el PCR y resultaran falsos negativos, para todas las pruebas se elaboró un control enriquecido o "spike". Este control consistió en añadir 0.5 μ M de ADN o ARN de la cepa de referencia a una muestra negativa previamente analizada (Dousse, *et al.*, 2008).

Se establecieron condiciones de amplificación para cada patógeno según la literatura consultada con algunas modificaciones. A continuación se presentan las condiciones de amplificación en para cada patógeno, así como los oligonucléotidos usados, la secuencia de cada uno de ellos y el tamaño (**Tablas 3-12**). La observación de los fragmentos amplificados de cada PCR fueron realizados mediante un sistema de electroforesis horizontal (Amersham Bioscience, Mini horinzontal submarine unit, HE 33) usando geles de agarosa a diferentes concentraciones según el tamaño del fragmento esperado. El voltaje usado fue 80V. Las bandas de ADN amplificado fueron observadas bajo luz UV y capturadas con el sistema analizador de imágenes ChemiDoc *Bio Rad* (Quantity one 4.4 Basic) (Sambrook y Russell, 2001).

Detección de Actinobacillus pleuropneumoniae por PCR

El análisis por PCR anidado fue desarrollado usando el método de MacInnes y col (2008) y Frey (2003) (**Tabla 3**). Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo por 1 minuto a 95°C, 35 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94°C, 35 ciclos de alineación de 30 segundos a 54°C, 35 ciclos de elongación de 1.5 minutos a 72°C y 1 ciclo de elongación final a 72°C por 5 minutos. La reacción de PCR contenía (volumen total 20 µl) 2.5 µl 10X PCR Buffer, 0.75 µl MgCl₂ 50mM, 2.0 µl dNTP's 2.5 mM, 1.0 µl de cada primer 25 µM, 0.25 µl Taq pol (5 U/ µl), 16.5 H₂O destilada, 2.0 µl de ADN problema. Para la segunda reacción de PCR (anidado) se usaron las mismas condiciones, solo se sustituyo el primer set de primers por el segundo set. Se empleo 1 µl del producto de la primera reacción como molde para el PCR anidado.

Gen Amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Fragmento (bp)
<i>apxIVA</i>	APXIVA-1L	TGG CAC TGA CGG TGA TGA T	441
	APXIVA-1R	GGC CAT CGA CTC AAC CAT	
<i>apxIVA</i> anidado	APXIVAN-1L	GGG GAC GTA ACT CGG TGA TT	377
	APXIVAN-1R	GCT CAC CAA CGT TTG CTC	

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR anidado en contra de *Actinobacillus pleuropneumoniae* usando el gen *apxIV* como blanco. Se muestra el tamaño del fragmento esperado (MacInnes et al., 2008; Sache, K. & Frey, J., 2003)

Detección de Bordetella bronchiseptica por PCR

El PCR fue desarrollado usando el método de Hozbor y col (1999), Resgister y DeJong (2006) (**Tabla 4**). Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo por 1 minuto a 95°C, 35 ciclos de desnaturalización por 60 segundos a 94°C, 35 ciclos de alineación de 30 segundos a 53°C, 35 ciclos de elongación de 20 segundos a 72°C y 1 ciclo de elongación final a 72°C por 5 minutos. La mezcla de reacción de PCR contenía (volumen total 20 µl) 2.5 µl 10X PCR (KCl) Buffer, 2.5 mM MgCl₂, 400 µM de cada dNTP's, 1.0 µM de cada primer, 2 µl de ADN de muestra problema y 0.25 µl Taq polimerasa.

Gen Amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>flaA</i>	Fla 2	AGG CTC CCA AGA GAG AAA GGC TT	237
	Fla 4	TGG CGC CTG CCC TAT C	

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR en contra de *B. bronchiseptica* usando el gen *flaA* como blanco. Se muestra el tamaño del fragmento esperado (Hozbor *et al.*, 1999; Resgister, K. & DeJong, 2006).

Detección de Haemophilus parasuis por PCR

El análisis por PCR fue desarrollado basado en el método de Blanco y col (2008), MacInnes y col (2008), Oliveira y col (2001) (**Tabla 5**). Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo por 1 minuto a 95°C, 35 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94°C, 35 ciclos de alineación de 30 segundos a 59°C, 35 ciclos de elongación de 2 minutos a 72°C y 1 ciclo de elongación final a 72°C por 5 minutos. La mezcla de reacción de PCR contenía (20 µl): 2.5 µl 10X PCR (KCl) Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 mM de cada dNTP's, 0.3 µM de cada primer, 2 µl de ADN de la muestra problema y 0.25 µl *Taq* polimerasa.

Gen amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>16s rRNA</i>	HPS- F	GTG ATG AGG AAG GGT GGT GT	821
	HPS-R	GGC TTC GTC ACC CTC TGT	

Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR en contra de *H. parasuis* usando un gen *16s ARNr* específico como blanco. Se muestra el tamaño del fragmento esperado (Blanco *et al.*, 2008; MacInnes *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2001).

Detección de Pasteurella multocida por PCR

El análisis por PCR contra las cepas toxigénicas de *Pasteurella multocida* fue desarrollado bajo las condiciones de Kamp y col (1999) (**Tabla 6**). Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo por 1 minuto a 95°C, 32 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 95°C, 32 ciclos de alineación de 60 segundos a 65°C, 32 ciclos de elongación de 2.5 minutos a 72°C y 1 ciclo de elongación final a 72°C por 20 minutos. La mezcla de reacción de PCR contenía (20 µl): 2.5 µl 10X PCR Buffer, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP's, 0.3 µM cada primer, 2 µl de ADN de muestra problema y 0.25 µl *Taq* polimerasa.

Gen Amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>toxA</i>	TOXA set 1-1F	GGT CAG ATG ATG CTA GAT ACT CC	338
	TOXA set 1-1R	CCA AAC AGG GTT ATA TTC TGG AC	

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR en contra de *P. multocida* usando el gen *toxA* como blanco. Se muestra el tamaño del fragmento esperado (Kamp *et al.*, 1999).

DetECCIÓN DE *Streptococcus suis* POR PCR

El análisis por PCR multiplex para la identificación de *S. suis* serotipo 2 o cualquier serotipo fue desarrollado basado en el método de Marois y col (2004) (**Tabla 7**). Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo por 1 minuto a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94°C, 40 ciclos de alineación de 30 segundos a 60°C, 40 ciclos de elongación de 1 minuto a 72°C y 1 ciclo de elongación final a 72°C por 10 minutos. La mezcla de reacción de PCR contenía (20 µl): 2.5 µl 10X PCR (NH4) Buffer, 2.5 mM MgCl₂, 600 µm de cada dNTP's, 1.1 µm de cada primer CPS2J, 600 nM de cada primer 16Sr, 2.0 µl de ADN de muestra problema y 0.25 µl *Taq* polimerasa.

Gen Amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>16s rRNA</i>	16S-195	CAG TAT TTA CCG CAT GGT AGA TAT	294
	16S-489	GTA AGA TAC CGT CAA GTG AGA A	
<i>cps2J</i>	CPS2J-F	GTT GAG TCC TTA TAC ACC TGT T	459
	CPS2J-R	CAG AAA ATT CAT ATT GTC CAC C	

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR múltiplex en contra de *S. suis* usando los genes *16S* ribosomal y *cps2J* como blancos. Se muestra los tamaños de los fragmentos esperados (Marois *et al.*, 2004).

DetECCIÓN DE *Mycoplasma hyopneumoniae* POR PCR

El método de Cai y col (2007) fue el empleado para la identificación de este patógeno (**Tabla 8**). Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo por 1 minuto a 95°C, 35 ciclos de desnaturalización por 20 segundos a 94°C, 35 ciclos de alineación de 30 segundos a 60°C, 35 ciclos de elongación de 40 segundos a 72°C y 1 ciclo de elongación final a 72°C por 7

minutos. La mezcla de PCR contenía (20 µl volumen reacción final) 2.5 µl 10X PCR Buffer, 2mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 0.2 µM de cada primer, agua destilada, 2.0 µl de ADN de la muestra problema y 0.25 µl *Taq* pol (5 U/ µl).

Gen Amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)
16S rRNA	MH649-F	GAG CCT TCA AGC TTC ACC AGG A	649
	MH649-R	TGT GTT AGT GAC TTT TGC CAC C	

Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el PCR en contra de *M. hyopneumoniae* usando el gen 16S ribosomal como blanco. Se muestra los tamaños de los fragmentos esperados (Cai *et al.*, 2007).

Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV)

Se siguió el método de Laroche y col (2003) (**Tabla 9**). Las condiciones de amplificación fueron; la mezcla de PCR se incubó a 25°C por un periodo de 5 minutos, seguida de una incubación a 55°C por 60 minutos y finalmente incubación a 99°C por 5 minutos. El RT-PCR, consistió de 1 ciclo por 3 minutos a 95°C, 39 ciclos por 45 segundos a 94°C, 39 ciclos por 45 segundos a 60°C, 39 ciclos por 1 minuto a 72°C y un ciclo final de elongación a 72°C por 10 minutos. La reacción de PCR contenía, **RT-PCR**, 1X RT Buffer, 3.0 mM MgCl₂, 2.5 mM de cada dNTP's , 8 µl de RNA de muestra problema, 3.0 mM MgCl₂, 10000 U Transcriptasa, 100 µl Random hexameros, **PCR**, 1 X PCR Buffer, 200 µM de cada dNTP, 2.5 nM MgCl₂, 10 pM de cada primer y 0.25 µl *Taq* polimerasa.

Gen amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)
ORF7	ORF7-R	ATGGCCAGCCAGTCAATCA	448
	ORF7-F	TCGCCCTAATTGAATAGGTG	

Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el RT-PCR en contra de PRRSV, usando el gen *Orf 5* como blanco. Se muestra los tamaños de los fragmentos esperados (Laroche *et al.*, 2003).

Virus de la Influenza porcina (SIV)

Las condiciones que se siguieron fueron tomadas de Choi y col (2002) (**Tabla 10**). La mezcla de PCR fue incubada a 95°C por 15 minutos. Después a esto la amplificación se realizó con 1 ciclo por 3 minutos a 94°C, 30 ciclos por 60 a 95°C, 30 ciclos por 30 segundos a 60°C, 30 ciclos por 1 minuto a 72°C y un ciclo final de elongación a 72°C por 10 minutos.

La mezcla de RT-PCR contenía, 20 µl 1X RT Buffer, 8.0 mM MgCl₂, 0.5 mM de cada dNTP's, 20U inhibidor de RNAsa, 50U trascirptasa reversa, 1 µl de RNA problema, 0.25 µl *Taq* polimerasa, PCR, 2.5 µl of PCR buffer 10X, 1.5 mM MgCl₂ ,0.25µM de cada oligonucleótido (.35 µl), 0.2 mM de cada dNTPs (0.2 µl), 5 µl amplificado de la primera reacción y 0.25 µl *Taq* polimerasa.

Gen amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)
H1	H1-F	GGG ACA TGT TAC CCA GGA GAT	1006
	H1-R	GCA TTG TAT GTC CAA ATA TCC A	
H3	H3-F	TAT GCC TGG TTT TCG CTC AA	663
	H3-R	TTC GGG ATT ACA GTT TGT TG	
N1	N1-F	GGT TCC AAA GGA GAC ATT TTT G	754
	N1-R	CTA TCC AAA CAC CAT TGC CAT A	
N2	N2-F	TGC GAT CCT GAC AAG TGT TAT C	502
	N2R	CAG ACA CAT CTG ACA CCA GGA T	

Tabla 10.Secuencia de los oligonucleótidos usados para el RT-PCR en contra de SIV, usando los genes *H1*, *H3*, *N1*, *N2* como blancos. Se muestra los tamaños de los fragmentos esperados (Choi *et al.*, 2002).

Circovirus porcino (PCV)

Las condiciones de amplificación fueron tomadas de Gagnon y col (2010) (**Tabla 11**). Consistió en 1 ciclo por 1 minuto a 95°C, 40 ciclos por 40 segundos a 95°C, 40 ciclos por 40 segundos a 55°C, 40 ciclos por 1 minuto a 72 ° C y un ciclo final de elongación a 72°C por 10 minutos. La mezcla de PCR fue, 2.5 µl 10X PCR (KCl) Buffer, 1.25 mM MgCl₂ ,0.2 mM de cada dNTP's, 0.5 µM de cada primer, 2 µl de ADN de la muestra problema y 0.25 µl *Taq* polimerasa

Gen amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Fragmento (bp)
<i>Orf1</i> PCV1	PCV1.ORF1.S1	GCC AAG CAA GAA AAG C	415
	PCV1.ORF1.AS1	CGT TAC AGG GAA CTG CTC	
<i>Orf2</i> PCV2	PCV2.ORF2-F	CTC TGA ATT GTA CAT ACA TGG TTA CAC GGA	667
	PCV2.ORF2-R	ATG ACG TAT CCA AGG AGG CGT TA	

Tabla 11.Secuencia de los oligonucleótidos usados para el RT-PCR en contra de PCV, usando los genes *Orf1* y *Orf2* como blancos. Se muestra los tamaños de los fragmentos esperados (Gagnon *et al.*, 2010).

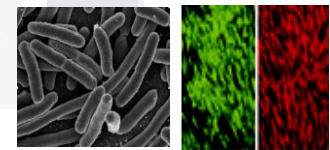
Coronavirus Porcino (PRCV)

El RT-PCR anidado fue diseñado siguiendo la metodología de Constantini y col (2004) y de Kim y col (2000) (**Tabla 12**). Las condiciones de amplificación fueron, la mezcla de RT-PCR se dejó incubar por 45 minutos a 55°C, seguida de una incubación a 95°C por 5 minutos. Posterior a la incubación 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, 30 ciclos por 60 segundos a 94°C, 30 ciclos por 1.5 minutos a 60°C, 30 ciclos por 2.5 minutos a 72°C y un ciclo final de elongación a 72°C 10 minutos. Para PCR anidado, 1 ciclo por 5 minute a 95°C, 30 ciclos por 60 segundos a 94°C, 30 ciclos por 1.5 minutos a 62°C, 30 ciclos por 2.5 minutos a 72°C y un ciclo final de elongación a 72°C por 10 minutos. La reacción de RT-PCR fue desarrollada con 10X PCR (KCl) Buffer, 5 µl 25 mM MgCl₂, 0.5 µl, 50 M de cada primer, 1.0µl de cada dNTP's (10 mM), 5U transcriptasa reversa, 20 U de inhibidor de RNAsa, 2.5 µl de muestra problema y 0.25 µl *Taq* polimerasa. Para la mezcla de PCR se utilizaron las mismas soluciones excepto Transcriptasa y inhibidor de RNAsa.

Gen amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Fragmento (bp)
<i>Orf1b</i>	F1	GGG TAA GTT GCT CAT TAG AAA TAA TGG	325-385
	R1	CTT CTT CAA AGC TAG GGA CTG	
<i>Orf1bN</i>	F2	TTG TGG TYT TGG TYG TAA TKC C	192-253
	R2	GGC TGT TTG GTA ACT AAT TTR CCA	

Tabla 12. Secuencia de los oligonucleótidos usados para el RT-PCR en contra de PRVC, usando los genes *Orf1b* y *Orf1 b N* como blancos. Se muestra los tamaños de los fragmentos esperados (Constantini *et al* 2004; Kim *et al.*, 2000).

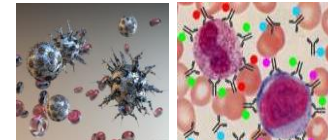
6.6 Pruebas de Viabilidad en agua de consumo



Para detectar la viabilidad bacteriana en las muestras de agua de consumo, fue usado el kit Live/Dead *BacLight* Bacterial Viability Kit (Molecular Probes). Cincuenta microlitros de la muestra de agua de consumo fueron tomados y diluidos en 950µl de agua destilada estéril. Después la mezcla fue centrifugada a 10000 rpm, durante 5 minutos. La pastilla obtenida fue resuspendida en 1 ml de agua destilada estéril. Posteriormente se combinaron en volúmenes iguales los reactivos A y B del kit Live/Dead *BacLight* Bacterial Viability Kit (Molecular Probes)

y se mezclaron generosamente. Posteriormente 3 µl de esta mezcla fue añadida a la muestra problema y se dejó incubar por 15 minutos en ausencia de luz (Boulos *et al.*, 1999). La preparación fue observada en un microscopio confocal Leica CTR4000 (Leica Microscope Microsystem, Germany) equipado con un analizador de imágenes (LAS AF image analyzer software).

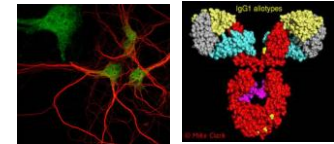
6.7 Obtención de anticuerpos policlonales dirigidos contra las proteínas totales de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.



Para la obtención de anticuerpos policlonales específicos en contra de las proteínas totales de App, se obtuvieron extractos celulares totales siguiendo el método de Gutiérrez Cantú y colaboradores (2011). Se creció *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 S-4074 en medio líquido BHI+ NAD, por 24 horas. Posteriormente el cultivo bacteriano en fase exponencial (OD~0.6) se cosechó a 5000 rpm por 10 minutos y se desechó el sobrenadante. La extracción de proteínas totales se realizó mediante 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Fosfato de Potasio monobásico 10mM y Fosfato de potasio dibásico 2mM) a 4°C, 10000 xg y 5 lavados de 5 minutos con acetona a 4°C a 10000 xg (Guerrero Barrera *et al.*, 1999). Los extractos se sometieron a una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida al 10%, teñido con azul de Coomassie (Bradford, 1976). Los carriles resultante fueron cortados y lavados con solución desteñidora y agua desionizada. Los anticuerpos fueron producidos en Conejas de raza Nueva Zelanda de 2.5 Kg a las cuales previo a la inmunización se le extrajo 5 ml. de sangre sin anticoagulante para obtener el suero preinmune. Para inmunizar las conejas se maceró uno de los carriles del extracto proteicos total obtenidos en la electroforesis. Finalmente se agregó un volumen igual de adyuvante de Freund. La inoculación fue intradérmica. La segunda inmunización se realizó de igual forma pero se empleó adyuvante incompleto de Freund. Para la tercera y cuarta inmunización se utilizó Hidróxido de aluminio e Hidróxido de Magnesio (Melox, Aventis) como adyuvante. Para la obtención del suero, los animales fueron sacrificados y se realizó punción cardiaca. La sangre obtenida fue mezclada con EDTA (15%) y se centrifugó a 10000 x g para la obtención del suero inmune. La purificación del anticuerpo se realizó mediante adsorción con suero preinmune y con extracto total de *Escherichia coli*, con el fin evitar la presencia de inmunoglobulinas no específicas presentes en el suero inmune. Finalmente se determinó el

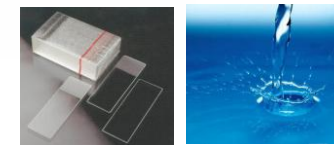
titulo del anticuerpo utilizando Western Blot usando el extracto total de App. Las diluciones usadas fueron 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 y 1:5000 (datos no mostrados) (Harold & Lane, 1998).

6.8 Reconocimiento específico de App en agua de consumo usando anticuerpos policlónales



Se comprobó la presencia de App mediante el uso de inmunotinción específica usando el anticuerpo policlónal descrito anteriormente y como anticuerpo secundario IgG anti conejo marcado con Alexa Fluor 594 (Molecular Probes). El marcaje fue realizado bajo el método de Guerrero-Barrera *et al* (1999), con modificaciones. Muestras de agua de consumo y de cultivo microbiológico (1 ml), se cosecharon a 5000 rpm por 10 minutos. La pastilla obtenida se lavó 3 veces con PBS K 1X centrifugando a 4000 X g, 5 minutos en cada lavado. Estos lavados se repitieron entre cada paso, previamente centrifugada la muestra. Después se añadió las células se permeabilizaron con metanol ACS (Fermont) y se centrifugó durante 10 min. Se fijaron las proteínas de la pastilla mediante PBS 1X- Formol 3.7% (pH 7.4) se incubó por 20 minutos a 37°C. Posteriormente la muestra se centrifugó 5000 X g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se agregó a la pastilla 200 µl (1: 50) del primer anticuerpo (anti-App). Esta mezcla se incubó por 1 hora a 37°C. Terminado el tiempo centrifugó la muestra y se tiró el sobrenadante. La pastilla fue lavada tres veces con Tween 20-PBS (T-PBS 0.025%) y después se añadió 100 µl (1:25) del segundo anticuerpo (IgG anti conejo marcado con Alexa Fluor 594, Molecular Probes). El segundo anticuerpo se dejó incubar por 1 hora a 37°C en ausencia de luz. Las muestras obtenidas se observaron mediante microscopia confocal (Leica, DMI 400 B). Se utilizó como control positivo *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, cepa S4074 y como control negativo *E. coli* O157:H7.

6.9 Hibridación *in situ* y WGA



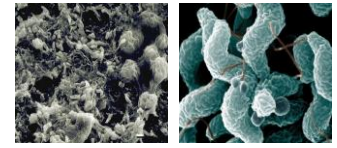
La Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y la técnica de marcaje con aglutinina de germen de trigo marcado se describen a continuación. Ambas técnicas se realizaron en biopelículas de muestras problema de agua de consumo provenientes de las granjas porcícolas así como en biopelículas de la cepa de referencia de App (App serotipo 1 S-4074) usadas como control

interno positivo y cepas de referencia de *E. coli*, (O157:H7) como control negativo. Para el control interno se generaron biopelículas de App en portaobjetos. Se colocó un portaobjetos estéril dentro de una caja Petri y se añadieron 25 ml de una suspensión bacteriana en fase estacionaria (25 ml BHI+NAD+ 2.5 ml de App medio líquido). Se incubó durante 24 horas a 37°C con 5% CO₂. Posteriormente se secó a temperatura ambiente. Para el caso de las muestras directas de agua de consumo, se añadieron 40µl de agua de consumo en un portaobjetos y se secó a temperatura ambiente. Para la hibridación se siguió el método de Lehtola y col (2006) y Rodríguez Núñez (2012) con modificaciones. Previo a la hibridación, las muestras se trataron con etanol (80%) por 20 minutos para fijar la muestra, se dejaron secar y se sometieron a un pretratamiento con Citrato de Sodio (1mM) a una temperatura de 95°C durante 5 minutos. Después se lavó la muestra con agua destilada (50°C), por 5 minutos. Las muestras fueron cubiertas con amortiguador de hibridación y con un cubreobjetos.

El amortiguador de hibridación contenía 180 µl de NaCl 5 M (Sigma), 20 µl de Tris-HCl 1M (Sigma), 1 µl de SDS 10% (Sigma), 1 µl de Triton X-100 (Sigma), 350 µl de Formamida (Sigma), 449 µl de agua destilada y 1.5 µM de oligonucleótido marcado (APXIVAN, Alpha DNA). El oligonucleótido fue marcado en el extremo 5' con Fluoresceina. La hibridación se llevó a cabo por 28 horas a 50°C, en ausencia de luz. Seguido del tiempo de hibridación, las muestras se lavaron por inmersión en 400 ml de buffer de lavado (0.35 gr NaCl, 0.242 Trisma Base y 400 µl Triton X-100), por un periodo de 25 minutos en ausencia de luz y a 50°C. Finalmente las muestras se lavaron con agua destilada y se secaron al aire. Para las muestras ambientales problema, se colocaron 25 µl de agua en un portaobjetos y se secaron a temperatura ambiente.

Después se sometió a la misma metodología de hibridación *in situ*, descrita anteriormente. Después de la hibridación, las biopelículas fueron incubadas con 100 µl de WGA (5µg/ml), conjugado con Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) diluido en PBS. Cada biopelículas fue incubada por 30 minutos en la oscuridad. Finalmente las muestras fueron lavadas para quitar el exceso de colorante. Las muestras fueron cubiertas con ProLong Gold (invitrogen). Todas las muestras fueron observadas en un microscopio confocal (Leica, DMI 400 B) y la toma de imágenes se realizó con el software del microscopio (LAS AF image analyser Leica).

6.10 Microscopía electrónica de barrido (MEB)



Las mismas muestras que fueron usadas para la inmunotinción específica y para el análisis por PCR, fueron sometidas a microscopía electrónica de barrido para la observación de biopelículas bacterianas. 3 μ l de la muestra de agua de consumo fueron tomadas y secadas a temperatura ambiente. Posteriormente, se deshidrataron con alcohol en diluciones crecientes (60-100%). La humedad en exceso fue removida con CO₂ líquido en una cámara Tousimis. Las muestras deshidratadas se cubrieron de oro usando una cámara especial (Chamber Desk II). Las muestras fueron observadas con microscopio electrónico de barrido (Jeol LV-5900) y las imágenes fueron capturadas por el software del microscopio (Baum *et al.*, 2009; Silva-Briano *et al.* 2007).

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

7.1 Muestreo de Granjas



Entre los meses de mayo a diciembre de 2008 y octubre 2009 a diciembre 2010, se muestrearon 17 granjas porcícolas del estado de Aguascalientes, México. Como se mencionó anteriormente, no se detectaron signos clínicos de enfermedad respiratoria en los animales. Sin embargo estudios previos mostraron que el más del 40 % de los cerdos del Estado de Aguascalientes presentan por lo menos pleuropneumonía porcina (Morfín Mata, 2010). Las granjas en el estudio fueron seleccionadas al azar y se realizó un muestreo aleatorio compuesto de agua y alimento de consumo, suelo, aire, exudado nasal y orina (Cochran, 1977; Daniel, 1997). El total de muestras obtenidas fue 408. Estas muestras fueron empleadas para la identificación de patógenos, pruebas de viabilidad, extracción de ácidos nucleicos, inmunotinción indirecta e hibridación in situ. Las **Tablas 13 y 14** resumen el número de muestras obtenidas y procesadas en la presente tesis, respectivamente.

Tipo de muestra	Muestras totales
Agua de consumo	168
Alimento de consumo	55
Aire	34
Suelo	54
Exudado Nasal	66 + 24Mh =90
Orina	7
Muestras totales	408 totales
ARN	36

Tabla 13. Número total de muestras obtenidas y procesadas en este estudio.

7.1.1 Muestras y extracción de ácidos nucleicos.

Entre los meses de mayo a diciembre 2008 y octubre 2009 a diciembre 2010, se muestrearon 17 granjas porcícolas del estado de Aguascalientes, México. Se tomaron muestras aleatorias y

compuestas (Cochran, 1977; Daniel, 1997) ambientales en las granjas: agua y alimento de consumo, suelo, aire, además de exudado nasal y orina. Se obtuvieron y procesaron un total de 444 muestras (**Tabla 14**).

Tipo de muestra	Muestras	Muestras procesadas
	Procesadas ADN	ARN
Agua de consumo	168	9
Alimento de consumo	55	9
Aire	34	-
Suelo	54	9
Exudado Nasal	90	9
Orina	7	-
Muestras totales	408	36

Tabla 14. Número total de muestras obtenidas y procesadas en este estudio.

Las muestras ambientales fueron procesadas para la extracción de ácidos nucleicos, la pureza y cantidad de los mismos se determinó a través de la relación de las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro de I.u.v (Cintra 10) a una longitud de onda de 280 nm/260 nm. Para el análisis por PCR se emplearon en promedio 0.15 µg por muestra como recomienda Sambrook et al., 2003. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 15**. La integridad del material genético obtenido se analizó en geles de agarosa.

Muestra	λ 260 (µg/ml)	λ 280
Agua de consumo	1.03	1.24
Alimento	0.56	1.32
Aire	1.09	1.50
Suelo	1.17	1.32
Orina	1.09	1.50
Nasal	0.278	1.17

Tabla 15. Cuantificación y calidad promedio de ADN usando espectrofotometría (λ 280 y λ 260).

7.1.2 Pruebas control para la identificación de patógenos respiratorios bacterianos

Antes de iniciar la identificación de los patógenos respiratorios en estudio, se estandarizó cada prueba de PCR. Se probaron los controles positivos y los controles negativos para evitar los falsos positivos en el análisis. Se establecieron controles externos negativos, que permitieron determinar la especificidad de los oligonucleótidos. Además se realizaron controles enriquecidos (spike) para evitar falsos negativos debido a la composición heterogénea de las muestras ambientales (Dousse *et al.*, 2008) **(Fig. 21-29)**.

Previo a la identificación de los patógenos respiratorios de las muestras de las granjas porcícolas, mediante PCR y RT-PCR, se realizó un control spike, un control positivo y un control negativo. Los controles enriquecidos realizados resultaron positivos, descartando de esta forma los falsos negativos por interferencia del contenido de la muestra. Como control positivo, se usó la cepa de referencia **(Tabla 2 y 3; Figs. 21-39)**.

Como se explicó en el apartado de metodología los controles negativos se hicieron bajo las mismas condiciones del control positivo con la única diferencia de carecer de molde de ADN o ARN **(Fig.30-39)**. Finalmente se hicieron pruebas cruzadas usando el primer específico para cada patógeno contra las demás bacterias o virus buscados en este trabajo, con ello se confirmó la especificidad de los primers usado.

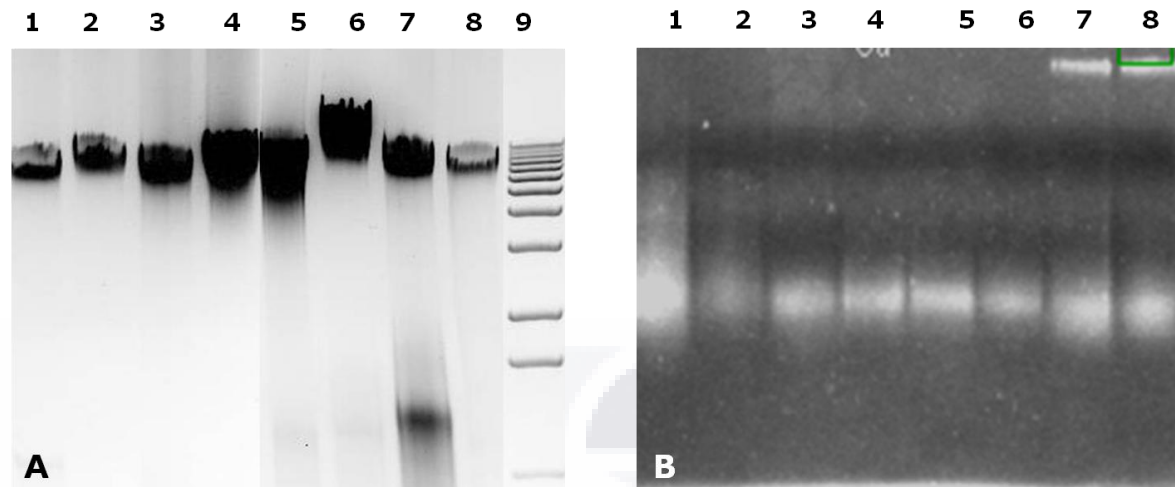


Fig. 21. Aislamiento de ADN y ARN de diferentes muestras ambientales provenientes de las granjas porcícolas bajo estudio, gel de agarosa 0.8%. **A)** ADN aislado usando gel de agarosa teñido con bromuro de Etidio y visto con luz negativa para observar mejor las integridad de las bandas; carril 9: MTM (1 Kb), carriles: 1-8 ADN de muestras ambientales (1 y 2 Agua, 3 y 4 Suelo, 5 y 6 Alimento, 7 exudado nasal y 8 Aire). **B)** Gel de agarosa ARN. Carriles 1-3 suelo, 4-8 alimento.

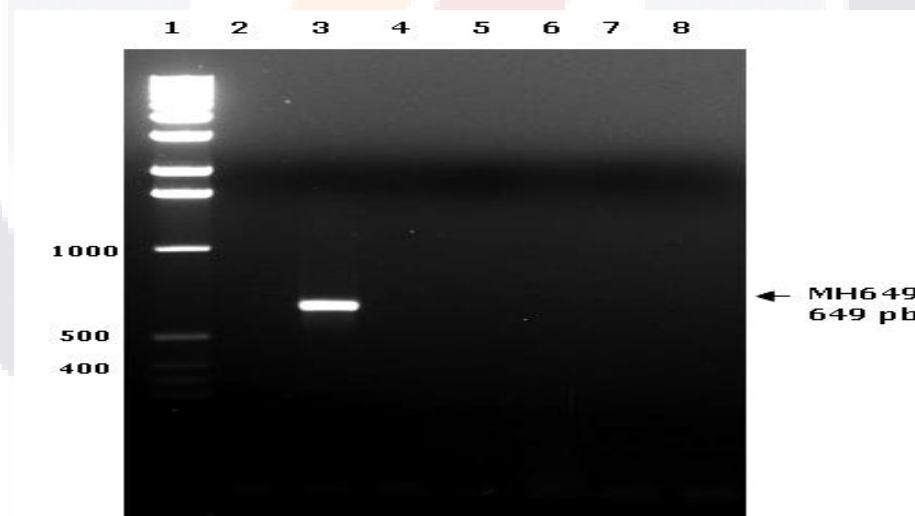


Fig. 22. Productos amplificados de PCR para *Mycoplasma hyopneumoniae* (MH649). Carriles: 1 MTM (1Kb), 2- Control negativo, 3- *Mycoplasma hyopneumoniae* ATTC, 4- *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1-S-4074, 5- *Pasteurella multocida* 4- 4056 (tipo D, DNT +), 6- *Bordetella bronchiseptica* 276, 7- *Haemophilus parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), 8- *Streptococcus suis* serotipo 2 (735). Agarosa 1.2%.

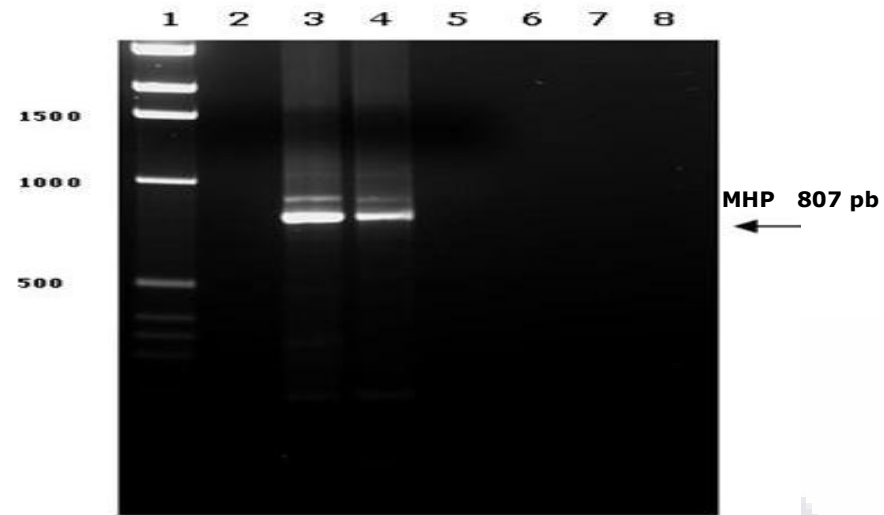


Fig. 23. Productos amplificados de PCR anidado para *Mycoplasma hyopneumoniae* (MHP). Carriles: 1- MTM (1Kb), 2- Control negativo, 3- *M. hyopneumoniae* (ATCC), 4- Control fortificado, 5- *H. parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), 6- *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 S 4074, 7- *Pasteurella multocida* 4-4056 (tipo D, DNT+), 8- *Bordetella bronchiseptica* (276). Agarosa 1.2%.

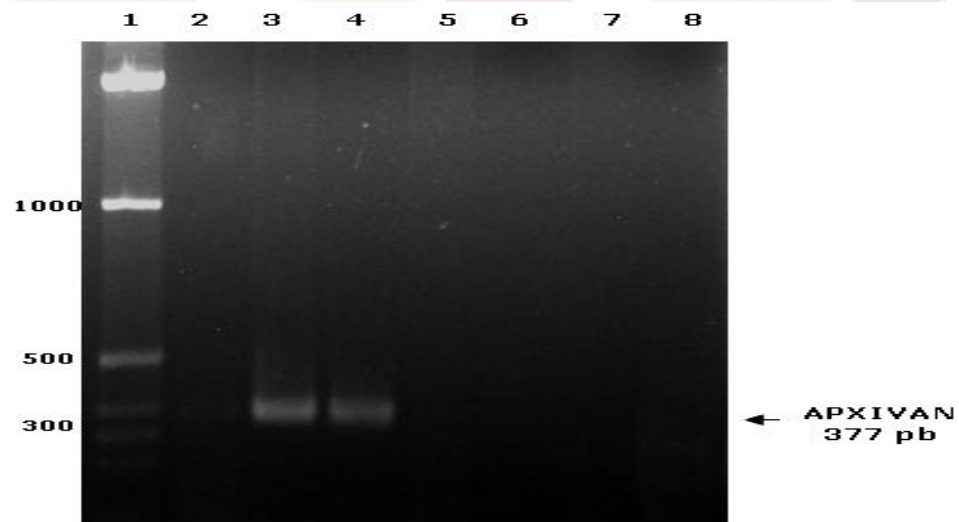


Fig. 24. Productos amplificados de PCR (anidado) para *A. pleuropneumoniae* (APXIVAN). Líneas: 1 MTM (1Kb), 2- Control negativo, 3- *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1-S-4074, 4- *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 5B, 5- *P. multocida* 4- 4056 (tipo D, DNT +), 6- *B. bronchiseptica* 276, 7- *H. parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), 8- *M. hyopneumoniae* ATTC. Agarosa 1.2%.

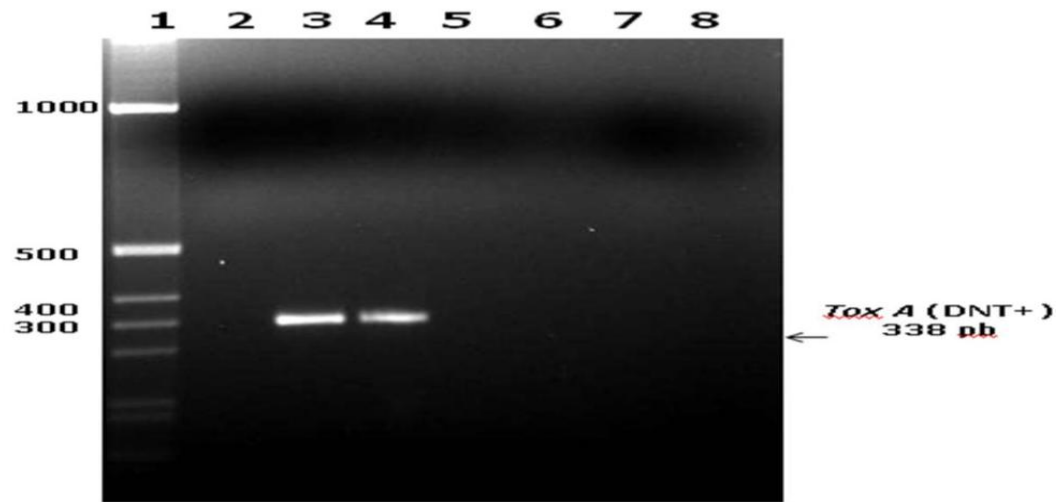


Fig. 25. Productos amplificados de PCR para *Pasteurella multocida* (*ToxA*). Carriles: 1 MTM (1Kb), 2- Control negativo, 3- *Pasteurella multocida* 4-4056 (tipo D, DNT+) 4- Control Fortificado, 5- *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 S 4074, 6- *B. bronchiseptica* 276, 7- *H. parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), 8- *M. hyopneumoniae* ATCC. Agarosa 2.0%.

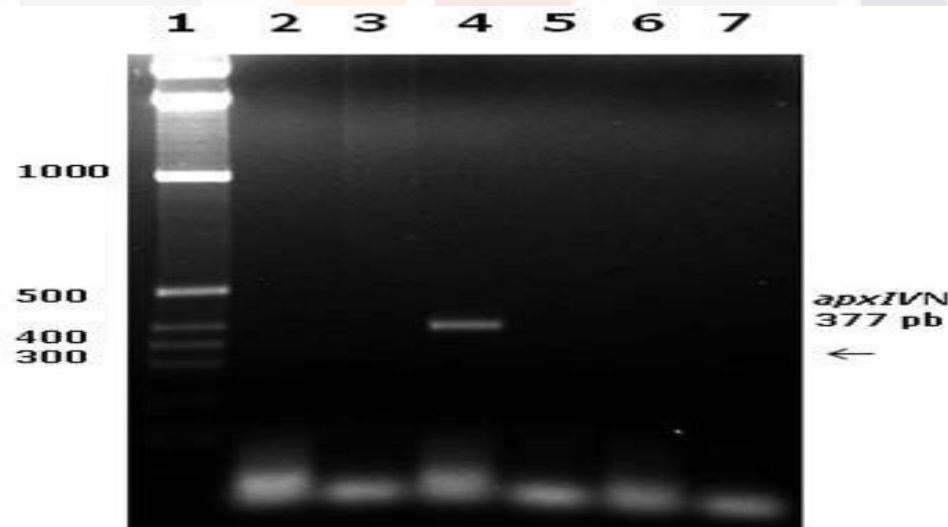


Fig. 26. Producto amplificado de PCR para *A. pleuropneumoniae* (*APXIVAV*) marcados con fluoresceína (hibridación). Carriles: 1 MTM (1Kb), 2- Control negativo, 3- *M. hyopneumoniae* ATCC 4- *Actinobacillus pleuropneumoniae* 5B, 5- *B. bronchiseptica* 276, 6- *H. parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), 7- *P. multocida* 4- 4056 (tipo D, DNT +). Agarosa 1.2%.

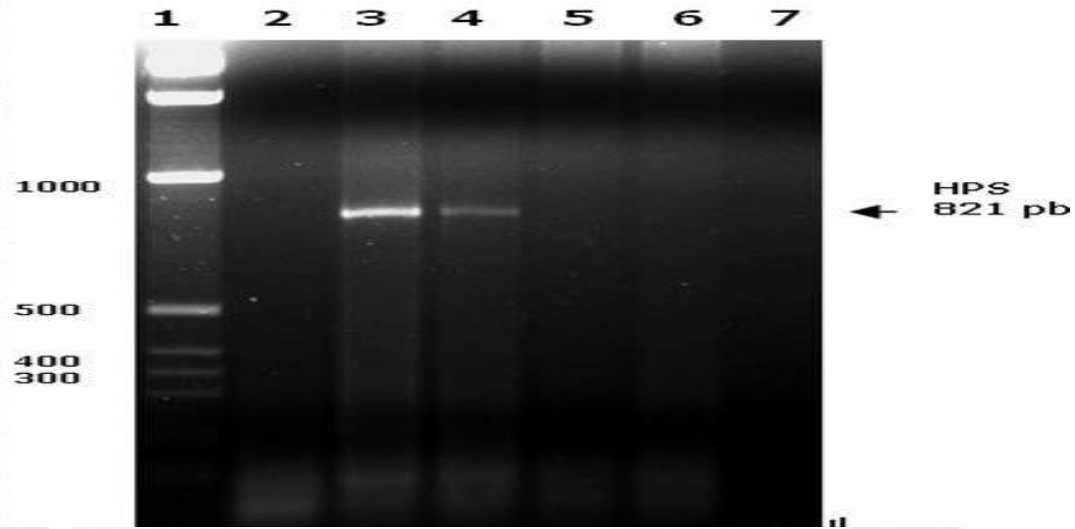


Fig. 27. Productos amplificados de PCR para *Haemophilus parasuis* (HPS). Carriles: 1 MTM (1Kb), 2- Control negativo, 3- *H. parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), 4- Control fortificado, 5- *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1 S 4074, 6- *Pasteurella multocida* 4-4056 (tipo D, DNT+) 7- *B. bronchiseptica* 276. Agarosa 1.2%.

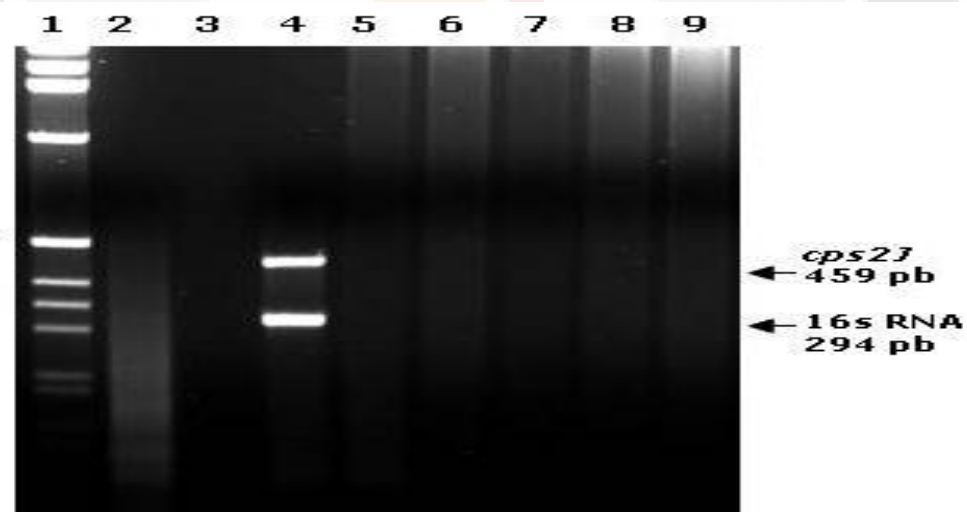


Fig. 28. Productos amplificados de PCR para *Streptococcus suis* (16s RNA y *cpsJ2*). Carriles: 1 MTM (1Kb), 2- Control negativo, 3- vacío 4- *Streptococcus suis* serotipo 2 (735), 5- *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1-S-4074, 6- *Pasteurella multocida* 4- 4056 (tipo D, DNT +), 7- *Bordetella bronchiseptica* 276, 8- *Haemophilus parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), 9- *Mycoplasma hyopneumoniae* ATCC. Agarosa 2.0 %.

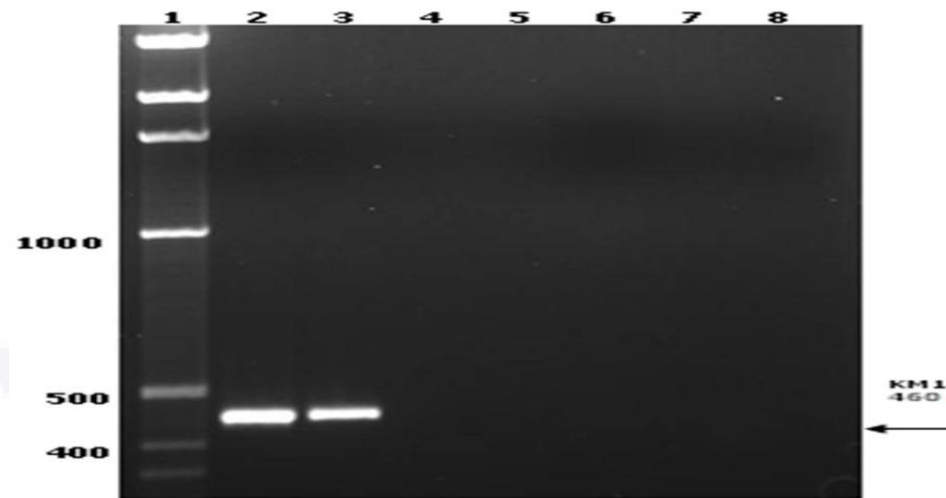


Fig. 29. Productos amplificados de PCR para *Pasteurella multocida* (KMT1). Carriles: 1 MTM (1Kb), 2- *Pasteurella multocida* 4- 4056 (tipo D, DNT +), 3- Control fortificado, 4- *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1-S-4074, 5- *Haemophilus parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), 6- *Streptococcus suis* serotipo 2 (735), 7- *Bordetella bronchiseptica* 276, 8- Control negativo. Agarosa 1.5 %.

7.1.3 Identificación de patógenos respiratorios bacterianos.

Actinobacillus pleuropneumoniae.

El agente causal de la pleuroneumonía, enfermedad que provoca grandes pérdidas económicas en la industria porcina debido a el alta morbi-mortalidad que produce (Enriquez-Verdugo *et al.*, 2003). Los serotipos 1, 5, 9 y 11 destacan entre los más virulentos debido a que presentan las toxinas ApXI y ApXII (Auger *et al.*, 2009). Los serotipos 1, 3, 5 y 7 son los más frecuentes en Norte América (Canadá y Estados Unidos). Nuestros resultados muestran App viable en el exudado nasal, también lo encontramos viable en agua de consumo, alimento, suelo y aire (Tabla 17), lo anterior apoya la hipótesis de la presente tesis que propone al como reservorio y medio de trasmisión de las enfermedades respiratorias de los cerdos (**Fig. 30**). Datos obtenidos por nuestro grupo indican una prevalencia del 40% de *A. pleuropneumoniae* en las granjas porcícolas de Aguascalientes (Cornejo- Amador, 2007; Morfin-Mata, 2009). Diversos autores proponen que la mayoría de las piaras están endémicamente infectadas con esta bacteria y solo una pequeña parte de los animales manifiesta la enfermedad clínica (Hernandez *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos indican que *A. pleuropneumoniae* se detectó mediante la toxina APXIV

(377 pb), que es específica de especie, y se encuentra en todos los serotipos y serovariedades de este patógeno (Auger *et al.*, 2009; Jirawattanapong *et al.*, 2010). Este patógeno fue encontrado en seis de las diez y siete granjas bajo estudio en agua y alimento de consumo, exudado nasal y orina (**Tabla 16**).

Haemophilus parasuis

Bacteria Gram negativa en forma de bacilos cortos, requiere del factor V y X para su crecimiento. Esta bacteria es la causante de la enfermedad de Glässer se manifiesta con poliserositis, meningitis, artritis y septicemia. Es común aislarlo del tracto respiratorio en animales enfermos o sanos, tal y como se le ha encontrado en este estudio (**Fig. 31**). A pesar de lo anterior, en el presente estudio no se logró identificar en muestras de ambiente de las granjas. Sin embargo se encontró en las muestras de exudado nasal obtenidas en una granja (**Tabla 16**). Para la identificación de este patógeno, se usó el oligonucleótido HPS, el cual es específico de especie, y amplifica un fragmento de 821 pb, correspondiente a un gen 16S ARN ribosomal (Blanco *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009).

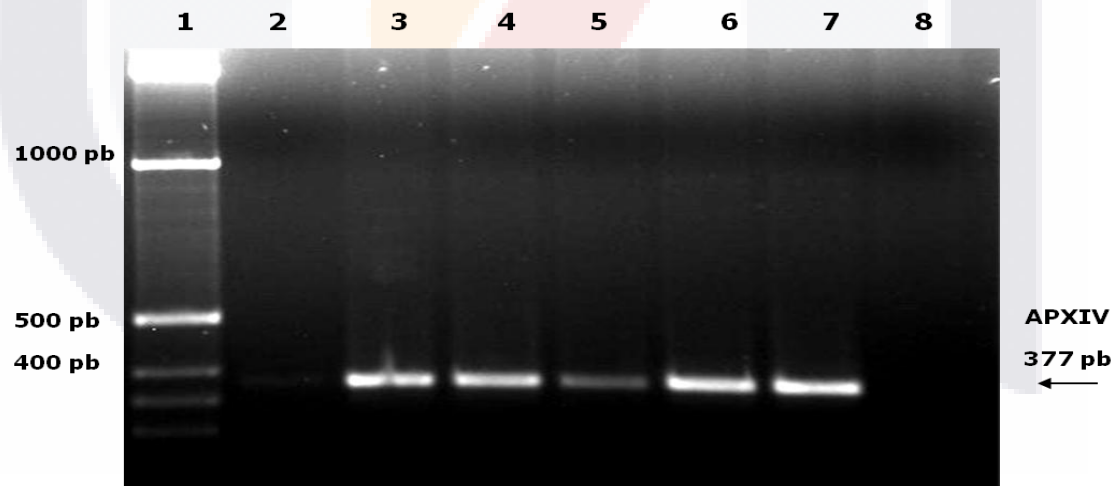


Fig. 30. Productos amplificados de PCR (377 pb), teñidos con Bromuro de Etido para *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Carriles: 1- MTM (1Kb), 2- Control negativo (sin ADN), 3- Control positivo *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 S-4074, 4 al 8- muestras de agua de consumo provenientes de granjas porcícolas. Agarosa 1.2%. 85 Volts.

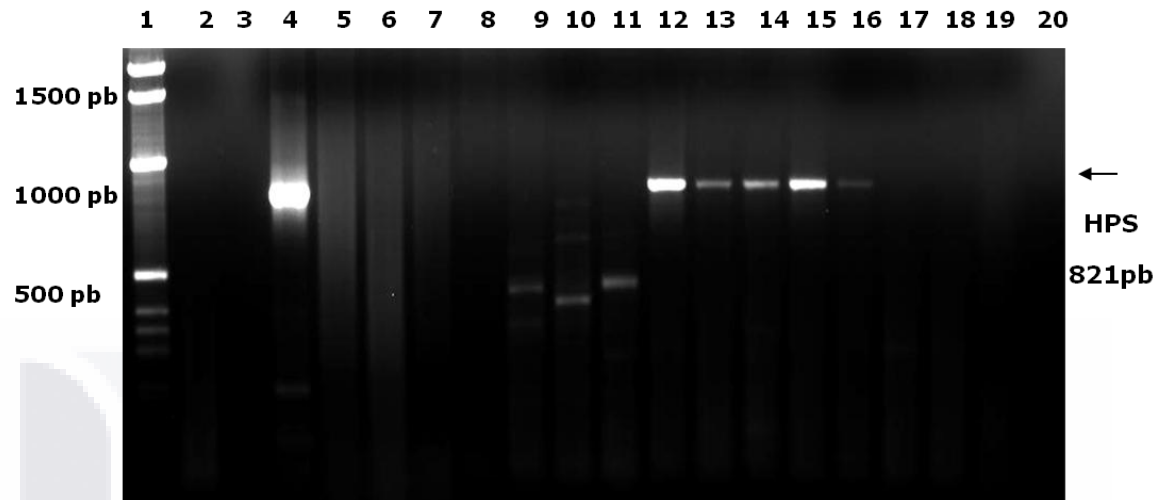


Fig. 31. Productos amplificados de PCR (821 pb), teñidos con Bromuro de Etido para la bacteria *Hemophilus parasuis*. Carriles: 1- MTM (1Kb), 2- Control negativo (sin ADN), 3- Vacío, 4- Control positivo *H. parasuis* serotipo 5 (Nagasaki), 5 al 6- Alimento, 7 al 11 aire, 12 al 16 exudado asal, 17 al 18- Orina, 19 y 20- Suelo. Agarosa 1.2%. 85 Volts.

Pasteurella multocida

Cocobacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Pasteurellacea*, anaerobia facultativa e inmóvil. Se pueden distinguir tres subespecies (ssp.), *P. multocida* ssp. *multocida*, *P. multocida* ssp. *gallicida* y *P. multocida* ssp. *septica*, siendo la subespecie *multocida*, la más comúnmente encontrada en cerdos (Chomnawang *et al.*, 2009; Ewers *et al.*, 2006; Varga *et al.*, 2007). Esta bacteria es conocida como parte de la flora normal del cerdo, así como el agente causal de gran variedad de infecciones, generalmente después de infecciones primarias producidas por otros patógenos o factores ambientales.

Los serogrupos A y D son comunes en cerdo, siendo el D el agente causal de la rinitis atrófica y el A causante de la neumonía enzootica. Así las cepas tipo A pueden ser encontradas con frecuencia en los pulmones de los cerdos, en cambio las cepas del tipo D son aisladas mas frecuentemente de la cavidad nasal (Chomnawang *et al.*, 2009; Ewers *et al.*, 2006; Varga *et al.*, 2007). Al igual que *A. pleuropneumoniae*, esta bacteria se ha encontrado en agua y alimento de uso, suelo, aire, exudado nasal, además de orina (**tabla 17**). Este patógeno fue encontrado en 23 de 69 muestras procesadas, en agua y alimento de consumo, suelo, aire, exudado nasal y orina (**Tabla 16**). Cabe señalar que el método empleado para la identificación de este

microorganismo, está basado en contra del gen *tox A*, el cual solo está presente en cepas toxigenicas, dejando de lado a las cepas comensales no patogénicas (**Fig. 32**). Sin embargo las cepas comensales, pudieran provocar enfermedad y pérdidas económicas si se exponen a otro patógeno respiratorio porcino, que merme las defensas de los animales (Kamp *et al.*, 1996). Por tal motivo se sugiere en un futuro se trabaje con un set de oligonucleótidos (KMT1T7 y KMT1SP6) dirigidos en contra del gen KMT1, gen específico de especie y presente en todos los serogrupos (**Fig. 32**).

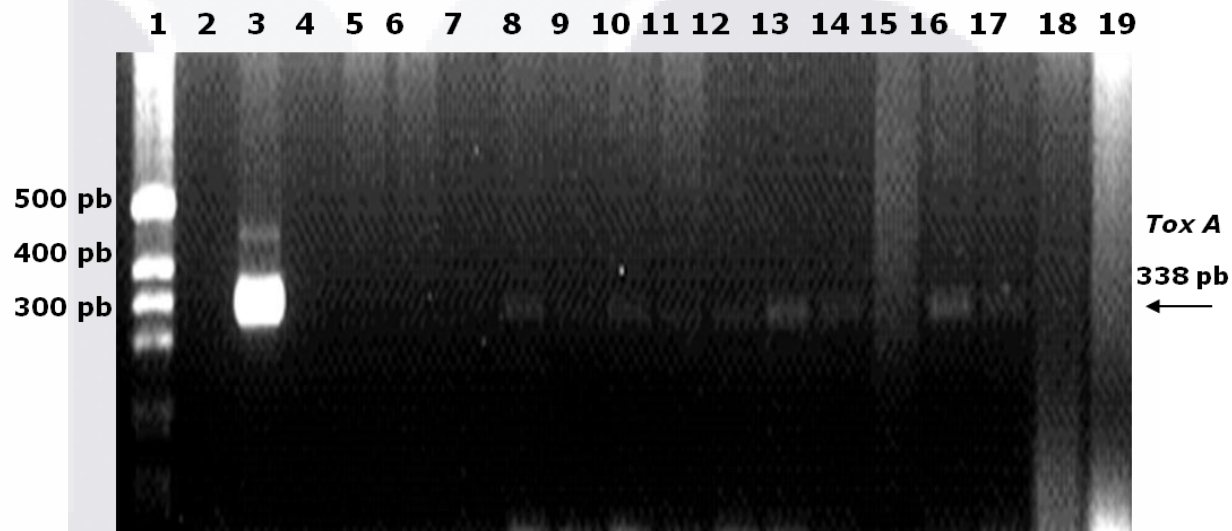


Fig. 32. Productos amplificados de PCR (338 pb), teñidos con Bromuro de Etido para la bacteria *Pasteurella multocida*, usando los primers TOXA. Carriles: 1- MTM (1Kb), 2- Control negativo (sin ADN), 3- Control positivo *P. multocida* serotipo 4- 4056 (tipo D, DNT+). 4 a 6 y 14- exudado nasale, 7 a 9 y 15- Suelo, 10 y 11- Aire, 12- Agua, 16 a 19- Alimento. Agarosa 1.2%. 85 Volts. El óvalo resalta las muestras positivas.

Streptococcus suis

Coco α- hemolítico, Gram positivo, anaeróbico facultativo, endémico de casi todos los países, es reconocido como uno de los principales patógenos respiratorios del cerdo y un agente zoonótico emergente (Feng *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2009). Basados en su polisacárido capsular, se han descrito 35 serotipos hasta el momento (1-34 y ½), sin embargo de todos ellos el serotipo 2 es el más comúnmente asociado a las infecciones en cerdos y humanos. Este patógeno causa neumonía, endocarditis, meningitis, artritis, septicemia y muerte súbita en cerdos (Feng *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2009).

Por tal razón se utiliza como método de identificación una serie de oligonucleótidos (prueba múltiple) (Marois *et al.*, 2004), que están dirigidos contra un gen 16S ARNr, para la identificación de cualquier serotipo y contra el gen *cpsJ*, que codifica para la capsula del serotipo 2 y 1/2 solamente (**Fig. 33**). *S. suis* es un patógeno de distribución mundial, de gran importancia en la industria porcícola. En las granjas bajo estudio se identificó en el exudado nasal, en muestras de aguay suelo. Este patógeno solamente lo encontramos en 6 de 131 muestras procesadas, dos de agua de consumo, una de suelo y tres de exudado nasal (**Tabla 16**). El serotipo encontrado no fue el 2 o 1/2, debido a la amplificación del fragmento correspondiente al gen 16S ARNr, presente en todos los serotipos, sin amplificación del fragmento correspondiente al gen *cpsJ*, presente en los serotipos 2 y 1/2 (**Fig. 33**).

Mycoplasma hyopneumoniae

Agente causal de la neumonía enzoótica, enfermedad con distribución mundial, y una de las enfermedades más comunes e importantes económicamente en la industria de la producción del cerdo. Incrementa la susceptibilidad del cerdo a patógenos como *A. pleuropneumoniae*, *H. parasuis*, *P. multocida*, virus de la Influenza porcina, el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino y circovirus porcino tipo II (Cai *et al.*, 2007; Fablet *et al.*, 2009). La vía de entrada más común de este patógeno a la pira es mediante aerosoles y se puede encontrar en muestras de la mucosa nasal o de la mucosa traqueal (Feng *et al.*, 2009). Se utilizaron dos series de primers, el primero basado en Cai y *col* (2007), sin embargo se observó una baja sensibilidad en la identificación de muestras ambientales. Por ese motivo, se utilizó un segundo set de cebadores propuestos por Kobish y Frey (2003), el cual consiste en un PCR anidado, el cual nos incrementa la sensibilidad, como se observo en nuestros resultados, al amplificar en la prueba de control enriquecido, a diferencia del método usado por Cai (**Fig. 22 y 23**). Solo se ha encontrado este patógeno en una sola muestra de exudado nasal cultivado en medio micoplasma (7 días de incubación), mediante el método de PCR anidado que resultó ser más sensible (**Fig. 34**).

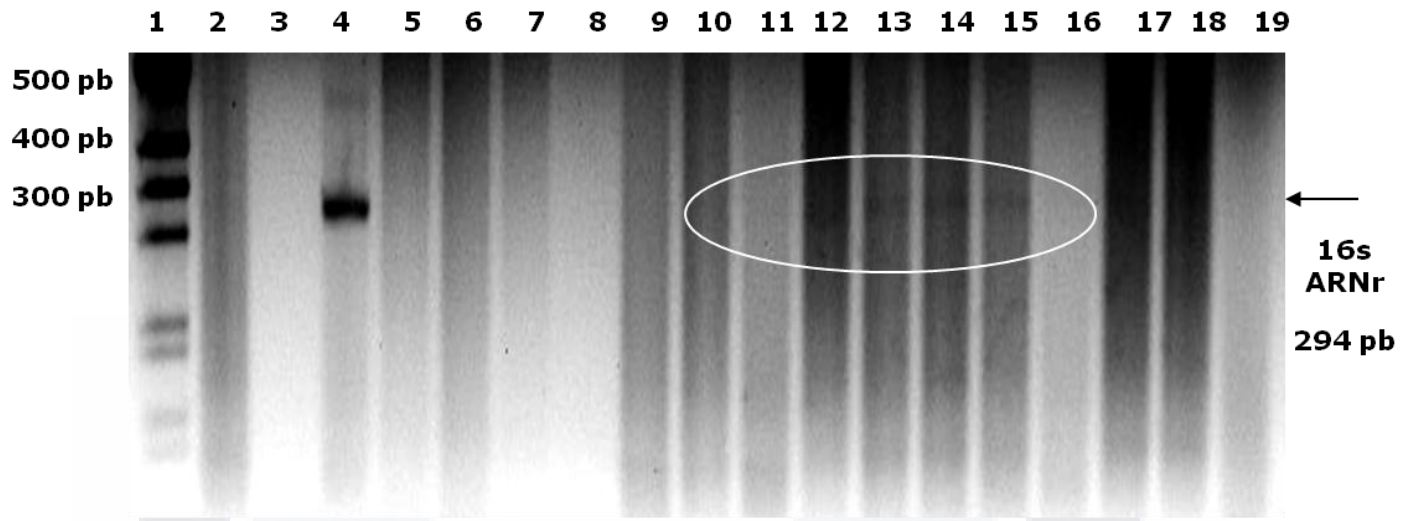


Fig. 33. Productos amplificados de PCR (cps2J 459 pb y 16s ARNr 294 pb), teñidos con Bromuro de Etido y observados con luz negativa contra la bacteria *Streptococcus suis* cualquier serotipo y serotipo 2, Carriles: 1- MTM (1Kb), 2- Control negativo (sin ADN), 3- Vacío, 4-Control positivo *Streptococcus suis* serotipo 2 (735), 5 a 6- Alimento, 7 al 11- Aire, 12 al 16-Nasales, 17 al 19- Orina. Agarosa 2.0%. 85 Volts.

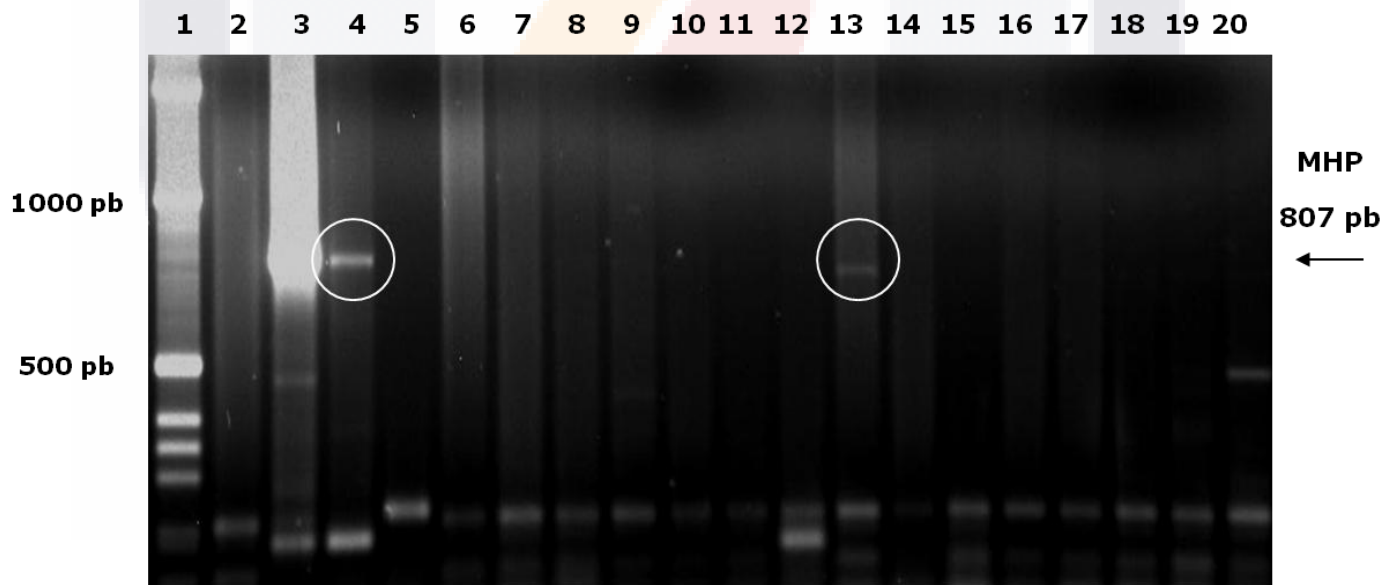


Fig. 34. Productos amplificados de PCR (MHP 807 pb), teñidos con Bromuro de Etido contra la bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae*. Carriles: 1- MTM (1Kb), 2- Control negativo (sin ADN), 3-Control positivo *Mycoplasma hyopneumoniae* ATCC, 4- Control fortificado Mh, 5 al 20- Muestras nasales de granjas cultivadas en medio Micoplasma. Agarosa 1.2%. 85 Volts.

Muestra	App	Mh	Pm	Ss	Hp	PRRSV	SIV	PCV2
Agua	28/130	0/11	3/10	2/26	0/24	4/4	2/9	0/11
Alimento	4/17	0/10	4/17	0/28	0/26	0/4	0/9	0/10
Suelo	2/13	0/10	2/11	1/25	0/19	0/5	0/9	0/10
Aire	17/22	NS	5/12	0/16	0/14	NS	NS	NS
Exudado Nasal	8/46	1/33	7/17	3/34	6/23	4/5	2/9	0/10
Orina	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	NS	NS	NS
Total	59/230	1/66	23/69	6/131	6/100	8/18	4/36	0/41
	26%	1.4%	33%	4.5%	6%	44%	11%	0%

Tabla 16. Resultados obtenidos por patógeno bacteriano y por muestra. Se señala de rojo las muestras positivas. App; *A. pleuropneumoniae*, Pm; *P. multocida*, Ss; *S. suis*, Hp; *H. parasuis*, Mh; *M. hyopneumoniae*.

7.1.4 Pruebas controles para la identificación de patógenos respiratorios de origen viral.

Antes de iniciar la identificación de los diversos patógenos respiratorios, se estandarizó cada PCR, RT-PCR. Se realizaron pruebas como controles positivos, controles negativos, usados para evitar falsos positivos en la prueba, controles externos negativos, que nos permiten confirmar la especificidad de nuestros oligonucleótidos y controles enriquecidos para evitar falsos negativos debido a la composición heterogénea de las muestras ambientales (**Fig. 35**).

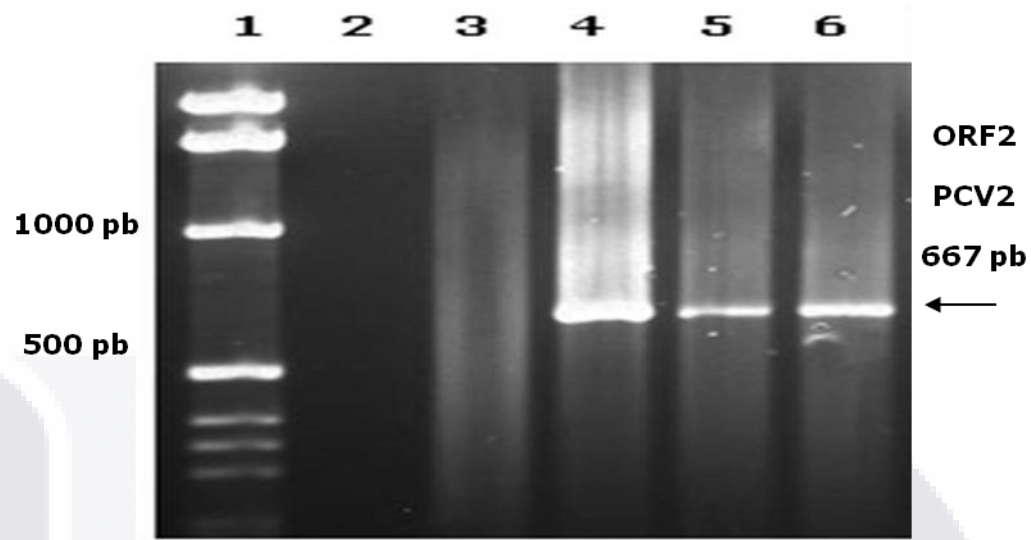


Fig. 35. Producto amplificado de PCR contra **PCV2** usando oligonucleótidos contra ORF2 (667 pb). Líneas: 1 MTM (1Kb), 2- Vacío, 3- C- sin ADN, 4- C+ PCV2, 5 y 6 Fortificados PCV2. Agarosa 1.2%. 80 Volts.

7.1.5 Identificación de patógenos respiratorios de origen viral:

Círcovirus porcino tipo 2 (PCV2)

Los circovirus son los virus de ADN mas pequeños que se conocen en la actualidad. Este genoma contiene por lo menos tres marcos de lectura abierta; ORF1 (proteínas de replicación del virus) ORF2 que codifica para la proteína de la nucleocápside y ORF 3 (apoptotica). Dos tipos de circovirus se han identificado. El PCV-1, es un virus no patógeno, caso contrario el PCV-2, del cual se reconocen actualmente tres genotipos (PCV-2a, 2b y 2c) (Gagnon *et al.*, 2010; Juhan *et al.*, 2010). Los cebadores empleados amplifican para el marco de lectura abierto (ORF2) presente en el PCV2, tanto en el tipo "2a" como en el "2b" (fragmento de 667pb). Se puede aislar de exudados nasales, orofaríngeos, sangre, suero, leche de hembras en lactancia y heces fecales, si embargo en los resultados obtenidos no se detectó este patógeno en las muestras de ambiente de granjas porcícolas (**Fig. 36**).

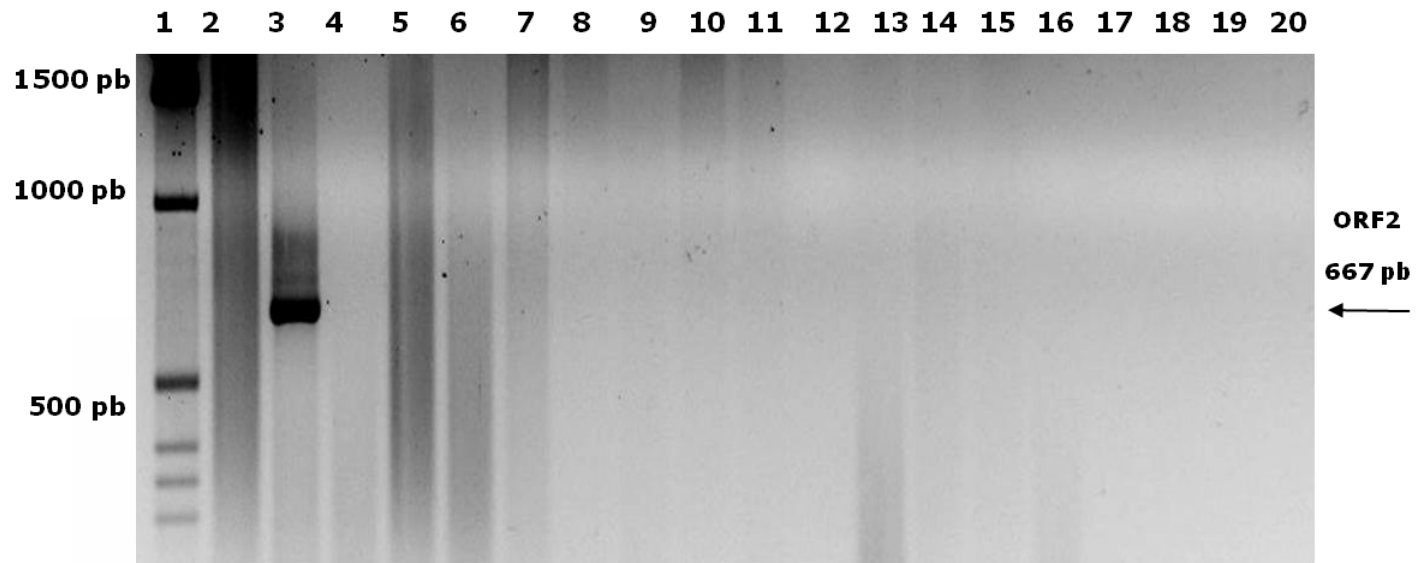


Fig. 36. Productos amplificados de PCR (ORF2 667 pb), teñidos con Bromuro de Etido contra el circovirus porcino tipo 2. Líneas: 1- MTM (1Kb), 2- Control negativo (sin ADN), 3-Control positivo PCV2 4 al 7 muestras suelo, 8 al 11- muestras de alimento, 12 al 15- muestras de agua de consumo, 16 al 20 muestras nasales. Agarosa 1.2%. 85 Volts.

Coronavirus respiratorio Porcino (PRCV)

El PRCV es un mutante natural, debido a una delección, del virus trasmisible de la gastroenteritis (TGE), el cual es un coronavirus porcino entérico. El PRCV presenta un genoma de ARN de 30 kb. Las tres proteínas principales son la proteína de la espiga (S), la proteína integral de la membrana (M) y la glicoproteína y la nucleocapside (N) (Cosntantini *et al.*, 2004). La metodología empleada para la identificación de este microorganismo, permite distinguir entre el TGE y el PRCV, con productos esperados de 1006 pb y 325-385 pb (874 pb y 193-253 pb en el anidado) respectivamente para cada virus (**Fig. 37**). El TGE aunque su sistema blanco es el sistema entérico, puede infectar el sistema respiratorio del cerdo.

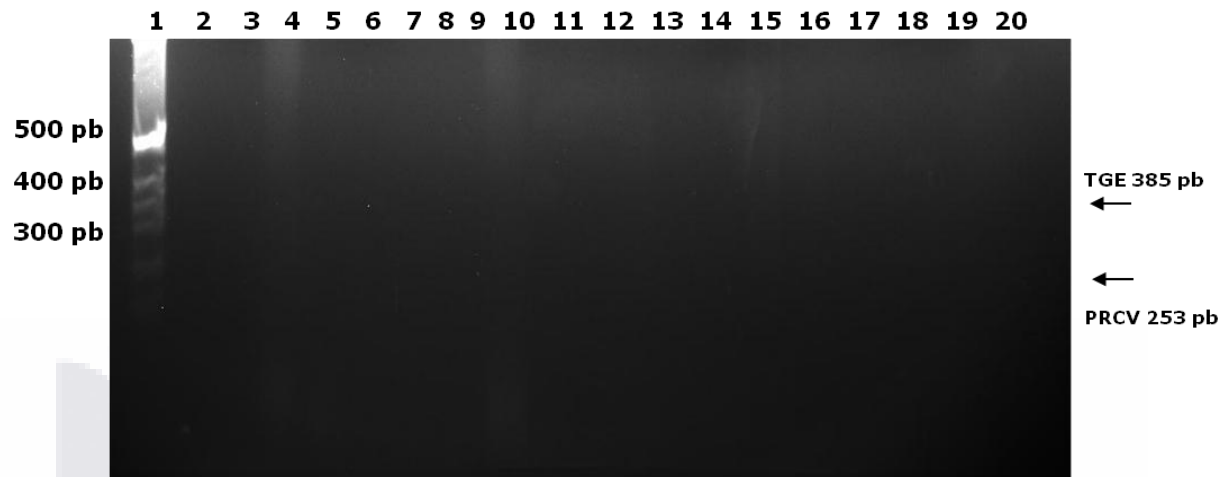


Fig. 37. PCR contra TGE (325-385) y PRCV (192-253): Carriles: 1-MTM, 2- Control negativo, 3 al 20 muestras ambientales. Carriles 3, 7, 11, 17, 19 nasales. Carriles 4, 9, 12, 16 y 20 suelo. Carriles 5, 8, 13 y 15 Alimento. Carriles 6, 10, 14 y 18 agua. Agarosa 1.5 %

Virus del Síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV)

Es un virus envuelto en una capa lipídica, con un genoma de ARN en sentido positivo. Dentro de su genoma, los marcos de lectura abierta ORF5, 6 y 7, codifican para la principal proteína estructural, de membrana, así como para la nucleocápside, respectivamente (Larochelle *et al.*, 2003, Mardassi *et al.*, 1995). Su dispersión incluye vía aerosoles, carne infectada y comida por los animales, vía nasal, contacto directo entre animales, por excretas y orina infectada, vectores como moscas o mosquitos infectados, gran variedad de fómites contaminados, además de semen. Se usó una serie de cebadores contra la región ORF7, que amplifica para las variedades Europeas y Americanas de este virus (**Fig. 38**).

Virus de la Influenza Porcina (SIV)

Estos virus presentan un genoma de 8 segmentos de ARN en sentido negativo. . Estos segmentos codifican para 10 proteínas, incluyendo a las dos glicoproteínas de superficie (Hemaglutinina HA y Neuraminidasa NA). Estas proteínas, le dan variaciones antigénicas y así estas proteínas permiten la generación de diversos subtipos de este virus. Así basados en las variaciones de los genes HA y NA existen 16 subtipos de HA (1 al 16) y 9 subtipos de NA (1 al

9), siendo los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2, los mas importantes (Choi *et al.*, 2002). Se empleó un RT-PCR multiplex, que permite la identificación de cada uno de los tres subtipos mencionadas anteriormente, compuesto por dos set de oligonucleótidos. La primer serie de los genes H, que amplifican fragmentos de 1006 pb para H1 y de 663 pb para H3 y el segundo set, de los genes N, permite una amplificación de fragmentos de 754 y 502 pb para N1 y N2, respectivamente (Choi *te al.*, 2002) **(Fig. 39)**.

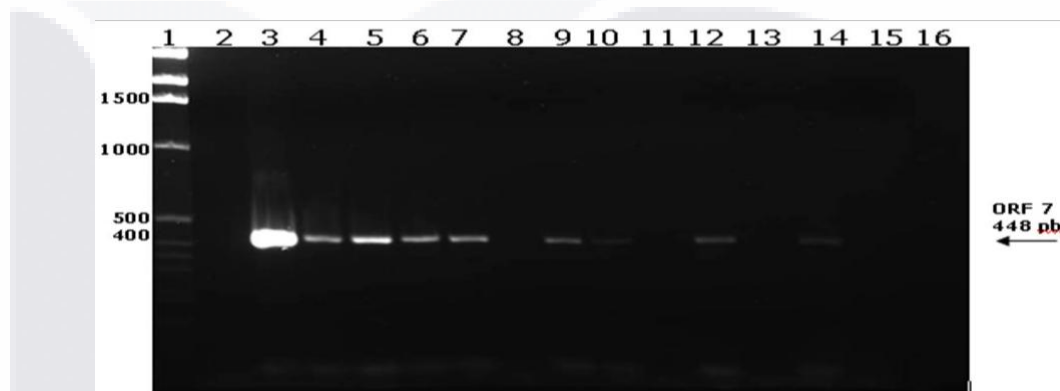


Fig. 38. Productos amplificados de PCR (ORF7 448 pb), teñidos con Bromuro de Etidio contra el PRRSV. Líneas: 1- MTM (1Kb), 2- Control negativo, 3- Control Positivo PRRSV, 4 a 16 muestras ambientales: Carriles 4, 6, 10 y 14 nasal. Carriles 5, 7, 9, 12 agua. Carriles 8, 11 y 13 Suelo. Carriles 15 y 16 Alimento.

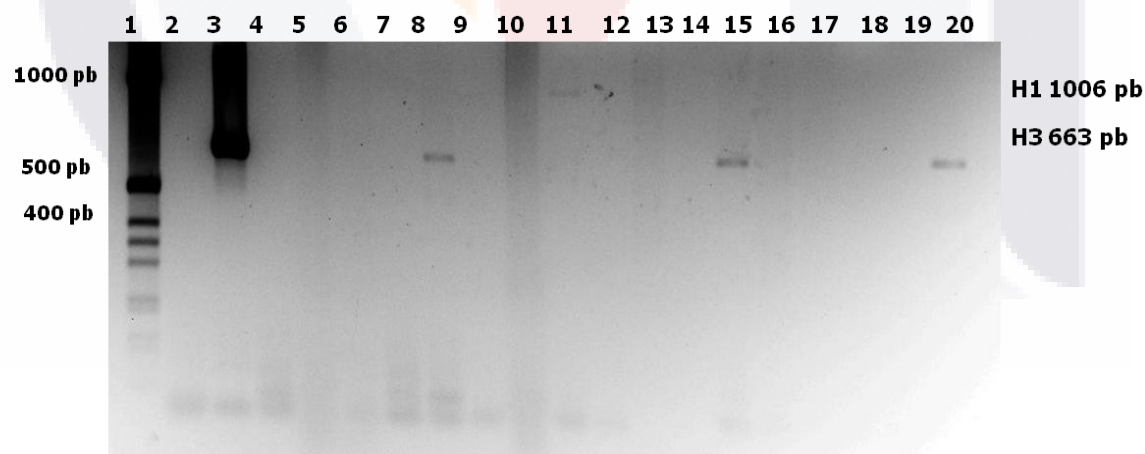


Fig. 39. PCR multiplex contra SIV usando oligos H1 (1006 pb) -H3 (663 pb). 1- MTM(1kb), 2- C- (sin ARN), 3- C+ (H1N1-H3N2), 4-20 muestras ambientales provenientes de granjas porcinas. Muestras 8, 15 y 20 positivas a H3 (Nasal, Agua, Nasal, respectivamente) muestra 11 positiva a H1 (agua). Agarosa 1.2%.

Se demostró la presencia de *A. pleuropneumoniae* en el ambiente que rodea al cerdo, además de en exudado nasal. Para su identificación se usó el primer APXIV anidado, el cual es específico de especie Frey (2003). Ninguna otra bacteria utilizada en este estudio amplificó cuando se usó este primer. La utilización de una prueba anidada de PCR, asegura una sensibilidad mayor, la cual va hasta los 10fg (Schaller *et al.*, 2001).

Por otro lado, *H. parasuis*, el cual solo fue encontrado en muestras de exudado nasal, usando los primers HPS, que amplifican para una región especie específica encontrada en todos los serotipos (Oliveira *et al.*, 2001), además de no amplificar para las demás bacterias bajo análisis en este estudio. La sensibilidad de esta prueba según Oliveira *et al.* (2001), es de hasta 69 pg de ADN del patógeno. Para el caso de la bacteria *P. multocida*, se usaron los primers TOX A, exclusivos para la cepa toxigénica (Kamp *et al.*, 1996). Esta prueba no amplificó para ninguna de las otras cepas buscadas en este trabajo. El límite de detección de esta prueba es de hasta 5 a 10 bacterias (25-50 fg) (Kamp *et al.*, 1996). Con ello se pudo detectar este patógeno en todo tipo de muestras analizadas.

Otro patógeno analizado fue *S. suis*, para el cual se desarrolló un PCR multiplex, con la capacidad de identificar, por un lado cualquiera de las 35 serotipos de *S. suis*, así como de identificar el serotipo 2, el cual se considera como el de mayor virulencia (Marios *et al.*, 2007). La sensibilidad de esta prueba es de 1.4 CFU (280 CFU ml⁻¹) para el serotipo 2 y de 0.14 CFU (28 CFU ml⁻¹) para todos los serotipos (Marios *et al.*, 2004). Los resultados hablan de la presencia de este patógeno solo en el 4.5% de las muestras analizadas. Solo en uno de los casos positivos se detectó el serotipo 2.

Para el caso de los patógenos de origen viral, se analizaron los virus del PRRS, SIV y PCV2. Los resultados para la detección del PCV2, fueron negativos para todas las muestras de ADN problema analizadas. La prueba de PCR para PCV2, no amplificó para los virus del SIV o del PRRSV. Además esta prueba, es específica para PCV2, al no amplificar el PCV1 (Gagnon *et al.*, 2010). La figura 47, corresponde a los productos amplificados del PRRSV (tipo americano, usando los primers ORF5 que tienen como blanco la región ORF5 (Laroche *et al.*, 2003). Por otra

parte, la identificación y subtipificación del SIV se realizó mediante dos RT-PCR múltiplex. Este par de PCR, pueden subtipificar al SIV en H1N1, H1N2 y H3N2. Esta técnica se ha probado ser específica para este virus al no amplificar para otras virus o bacterias respiratorias patógenas de cerdo (Choi *et al.*, 2002). Tanto el PRRSV como el SIV solo se encontraron en muestras de agua de consumo y exudado nasal.

Las enfermedades respiratorias se encuentran distribuidas en todos los países y climas en donde se realiza la producción de cerdo de manera intensiva, con valores de prevalencia que pueden llegar hasta el 100%. En años pasados, estas enfermedades representaron la mayor causa de morbilidad (de hasta el 40%) y mortalidad en los cerdos, con mortalidades de más del 50% en lechones y cerdos jóvenes y 60% en cerdos en engorda o de salida (Hansen *et al.*, 2010; Nicholson *et al.*, 2009). Para México sin embargo pocos trabajos se han desarrollado acerca de la incidencia de estas enfermedades así como del tipo de patógeno que la provoca. Los principales patógenos respiratorios porcinos fueron identificados en este trabajo. Estos patógenos son también los más comunes en el complejo respiratorio porcino.

Los patógenos de origen bacteriano *A. pleuropneumoniae* y *P. multocida*, fueron los organismos con mayor incidencia. *A. pleuropneumoniae*, es una especie respiratoria patógena específica del cerdo, es el agente etiológico de la pleuropneumoniae porcina ya sea aguda, crónica o hiperaguda (Ito 2010; Jirawattanapong *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Deslandes *et al.*, 2010). Los resultados positivos basados en la amplificación del gen *apxIV*, señalan la presencia de esta bacteria en todo tipo de muestra, a excepción de muestras de orina. Trabajos de Williams *et al.* (2000), en el sur de México, coinciden con la alta incidencia de *A. pleuropneumoniae*, al demostrar que alrededor del 60% de los cerdos que llegan a los rastros presentan lesiones neumónicas, y en el 51% de los casos, el responsable es *A. pleuropneumoniae*. No se serotipificaron las muestras positivas, pero los serotipos más frecuentes en México y en Norte América son el 1, 3, 5, 7 y 12 (Hennessy *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 2000; MacInnes *et al.*, 2008; Auger *et al.*, 2009; Grasteau *et al.*, 2011).

Por otra parte, *P. multocida*, es conocida como parte de la flora normal del cerdo, así como el agente causal de gran variedad de infecciones, generalmente después de infecciones primarias producidas por otros patógenos o factores ambientales (Kalorey *et al.*, 2008; Bethe *et al.*, 2009, Hatfaludi *et al.*, 2010). Se logró identificar las cepas toxigénicas en todo los tipos de muestras ambientales, además de exudado nasal y orina. Los resultados se basaron en la amplificación del gen *ToxA*, el cual se encuentra en todas las cepas toxigénicas y ausentes en la mayoría de las cepas no toxigénicas (Kamp *et al.*, 1996; Hsuan *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que estas dos bacterias se presentan viables en agua de consumo, alimento, aire y suelo, medios que rodean a los cerdos, además de estar presentes en el cerdo al encontrarse en muestras de exudado nasal y orina. De las muestras de exudado nasal bajo estudio, en el 5.5 % se encontraron ambas bacterias, en el 8% se encontraron *P. multocida* y *H. parasuis* y en el 8% de las muestras de exudado nasal se identificó *P. multocida*, *S. suis*, y *H. parasuis*.

Para el caso de *S. suis*, fue identificado en muestras de agua, suelo y en exudado nasal, sin embargo no fue encontrado el serotipo 2, el cual es el más patógenos de todo ellos (Meng *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). La ausencia de *S. suis* serotipo 2, puede deberse a la baja incidencia de este patógeno en América del Norte (MacInnes *et al.*, 2008; Bonifait *et al.*, 2010). Se identifico *S. suis* y *H. parasuis* en el 8% de los casos de exudado nasal.

Por otra parte la identificación de los virus del PRRSV y de la Influenza porcina, virus comunes del complejo respiratorio porcino, se realizo en exudado nasal y en agua solamente. En el 22% de los casos se encontró a ambos virus en agua y en exudado nasal. Además en el 11% de las muestras de agua se encontró el PRRSV y *P. multocida* y en el 20% de las muestras de exudado nasal asociado a *A. pleuropneumoniae*. Los resultados son consistentes debido a que es común encontrar a miembros de la familia Pasteurellaceae además de algunas bacterias Gram positivas como *S. suis* (Baele 2001), además de los virus del PRRSV y SIV, son microorganismos comunes del complejo respiratorio porcino y la presencia de algunos de ellos como por ejemplo el PRRSV, facilita la colonización del tracto respiratorio por otros patógenos (Brockmeier *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2012).

Así, la combinación de los patógenos respiratorios encontrados son las más frecuentemente encontradas en los cerdos bajo crianza intensiva (Fablet *et al*, 2011). Sin embargo en relación a la existencia de estos patógenos en el medio que rodea a los animales, pocos estudios existen, por lo cual no hay datos para comparar con estos hallazgos. Finalmente, en la actualidad, no existen datos en México para poder comparar los resultados obtenidos y con ello determinar la dinámica de estos patógenos. Para descartar la influencia que puede tener sobre la presencia de los patógenos respiratorios a lo largo del año, se deben realizar más estudios estacionales de la distribución de los patógenos empleados en el presente trabajo.

7.1.6 Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en agua de consumo de granjas porcícolas.

Viabilidad celular de las muestras de agua de consumo

Después de identificar App en las muestras de agua de consumo, se realizó la prueba de viabilidad de estas pruebas (n=24), empleando el kit Dead/Live Bactlight (Molecular Probes). Con esta prueba se determinó una viabilidad los microorganismos de por lo menos al 90% en todas las muestras, marcadas de verde por el kit antes mencionado **(Fig. 40)**.

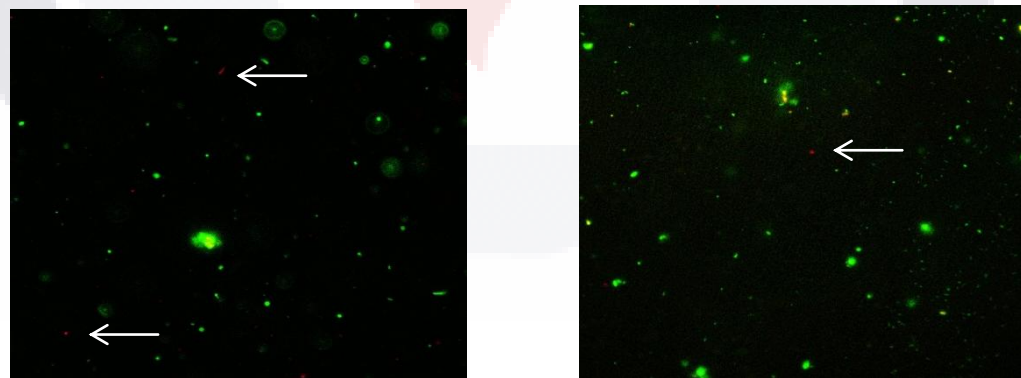


Fig. 40. Prueba de viabilidad en las biopelículas presentes en el agua de consumo de las granjas porcícolas realizada con el Kit- Live/Dead Bactlight Molecular Probes. Las células vivas se fluorescen verdes, mientras que las muertas fluorescen rojas (flechas).

*Cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* proveniente de agua de consumo*

Para verificar si App encontrado en las muestras de agua eran cultivables (viables), alícuotas de muestras de agua (positivas a App por PCR) fueron inoculadas en agar BHI suplementado con NAD (15 µg/ml). Después, las colonias de este medio fueron sembradas en agar sangre en presencia de *S. aureus* β-hemolítico. Las colonias que presentaron β-hemolisis fueron consideradas sospechosas a App y caracterizadas posteriormente. Dicha caracterización incluía hemolisis, reacción de CAMP, actividad de ureasa y dependencia de NAD (Kiorpes *et al*, 1990). Además, extracciones de ADN de dichas colonias y usadas para PCR. Estas pruebas confirmaron que las colonias β-hemolíticas eran APP.

Identificación de App mediante Inmunotinción

Usando muestras de agua de consumo cosechadas de cultivos bacteriológicos de agar BHI, fueron usadas para esta identificación y los resultados confirmaron la presencia y viabilidad de App en las 25 muestras de PCR positivas de este medio (**Fig. 41-B**), Cultivos puros de App S4074, muestras de agua de consumo de las granjas porcícolas y cultivos de muestras positivas a PCR fueron incubadas en ausencia del primer anticuerpo. Cultivos puros de App S4074, se utilizaron como control positivo (**Fig. 41-A**) y se utilizaron como control negativo con Alexa Fluor 594 nm (Molecular Probes).

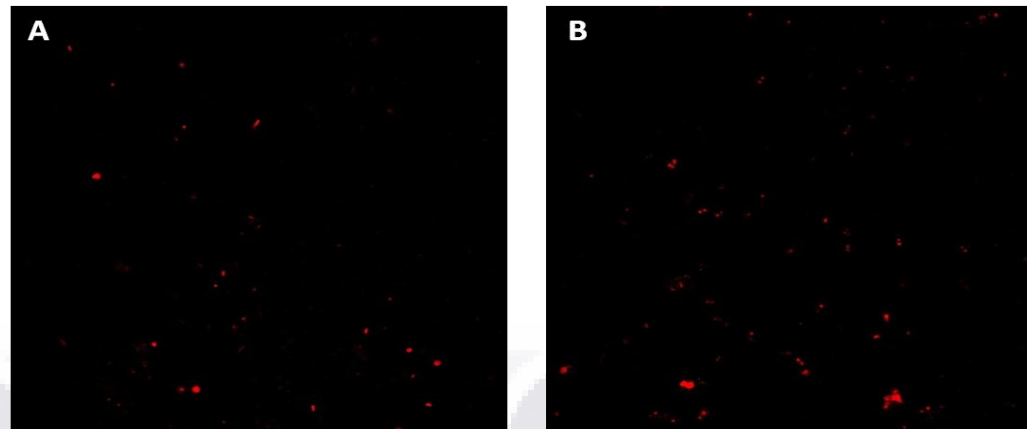


Fig. 41. A. Control positivo de inmunotinción, usando App S4074. B. Células provenientes del cultivo de agua de consumo en agar BHI suplementado con NAD. Las células fueron marcadas con un anticuerpo primario policlonal anti-*Actinobacillus pleuropneumoniae* y un anticuerpo secundario anti conejo Alexa Fluor 594 nm.

Biopelículas en muestras de agua de consumo

Microscopía electrónica de barrido (MEB), fue utilizada para determinar la biomasa de las muestras positivas de PCR. Los datos de la MEB, muestran estructuras parecidas a biopelículas en las muestras procesadas (**Fig. 42**).

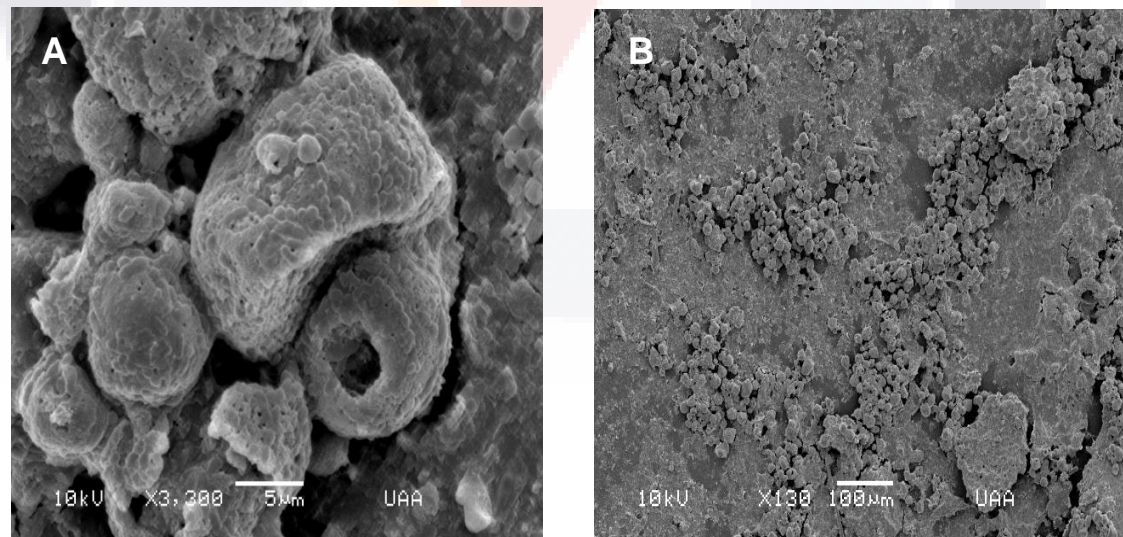


Fig. 42. Biopelícula bacteriana formada en el agua de uso de una granja porcícola. A) 3300 X y B) 130 X. Observación realizada en un microscopio electrónico de barrido. Jeol JSM-5900LV.

Los resultados obtenidos mediante las técnicas moleculares y técnicas bacteriológicas como cultivos y pruebas bioquímicas nos sugieren que el agua de consumo, el alimento, excretas y orina pueden ser un vehículo para la propagación y transmisión de estos patógenos dentro de los criaderos porcícolas. Cabe señalar que faltan más experimentos que nos confirmen estos resultados preliminares, así como la exploración de otros patógenos respiratorios.

Hibridación in situ

Se ha encontrado viable a la bacteria *A. pleuropneumoniae* en el agua de consumo de las provenientes de granjas porcícolas del estado de Aguascalientes. Esto se ha logrado mediante el uso de PCR, empleando oligonucleótidos específicos, confirmando estos resultados utilizando inmunotinción específica contra *A. pleuropneumoniae* y pruebas bioquímicas. Con el uso de pruebas de viabilidad y medios de cultivos se ha podido observar la viabilidad de la bacteria en dicho medio. Además con el uso de microscopía electrónica de barrido, se han encontrado biopelículas en estos medios en donde reside *A. pleuropneumoniae*. Se cree que *A. pleuropneumoniae* se encuentra viable en el agua de consumo, debido a la a la formación y asociación a las biopelículas encontradas en este medio.

Las biopelículas son comunidades bacterianas adheridas a una superficie inerte o tejido vivo y embebidas en una matriz de exopolisacáridos, donde conviven diferentes cepas bacterianas. Estas células son fisiológicamente activas, metabólicamente coordinadas y notablemente resistentes a agresiones físicas o químicas. La formación de biopelículas por parte de las bacterias es una estrategia al parecer muy antigua que les permite sobrevivir por más tiempo a fluctuaciones del ambiente, como cambios de pH, temperatura, humedad o de nutrientes y facilita la remoción de los desechos producidos por las bacterias (Lasa, 2005; Singh *et al.*, 2003). Por otra parte se conoce que *A. pleuropneumoniae*, es una bacteria formadora de biopelículas, estructura sumamente importante en la colonización, patogénesis y transmisión de esta bacteria cuando invade a su hospedero (Kaplan & Mulks, 2005).

Todo lo anterior hace pensar que la bacteria sobrevive en el agua de consumo debido a las biopelículas. Por tal motivo se con el fin de confirmar la asociación de App a las biopelículas encontradas en el agua de uso, se emplea la Hibridación *in situ*, usando sondas específicas para App, marcadas con un flourocromo (marcado en el extremo 5' con Flouresceina). Se ha estandarizado la técnica de hibridación *in situ*, usando oligonucleótidos específicos contra App sobre biopelículas formadas por App o formadas por una mezcla de bacterias (**Fig. 43**). Nuestros resultados sugieren una buena formación de biopelículas, un buen reconocimiento por parte de la sonda empleada, además de especificidad de la misma (Fig. **43 y 44**). Además, esta técnica se empleo para identificar a este patógeno sobre muestras de agua de consumo provenientes de las granjas problema (**Fig. 44**). App, fue encontrada mediante la técnica de PCR en agua de consumo de varias granjas. Además, esta información fue confirmada mediante el uso de inmunotinción e hibridación *in situ*.

La transmisión de App puede ocurrir por contacto directo entre los animales o por aerosoles a cortas distancias. La presencia de esta bacteria en el ambiente que rodea a los credos, mas específicamente en el agua de consumo, no había sido anteriormente investigado. Las bacterias usan a los biopelículas o biofilms como estrategia para poder sobrevivir en el ambiente. Así, la habilidad de formar biopelículas es considerada como un factor de virulencia en las bacterias patógenas. En estado natural, las biopelículas son comunidades de bacterias de diversas especies adheridas a una superficie y rodeadas de una matriz de exopolisacarido. Muchos estudios han demostrado que esta estrategia de la formación de las biopelículas, es usada por diversas bacterias patógenas como medio de supervivencia y además como vehículo de transmisión en sistemas de agua. Giao et al (2010), demostró que *Helicobater pylori*, persiste dentro de las biopelículas cuando el agua donde se encuentra es tratada con bajas concentraciones de cloro (0.2 y 1.2 mg/ml). Kamruzzaman et al (2010) confirmo que la bacteria *Vibrio cholerae*, *Legionella spp* y *Pseudomonas aeruginosa*, también usan biopelículas para sobrevivir en el ambiente donde se desenvuelven. Recientemente se ha reportado que diversas cepas de App con capaces de formar biopelículas *in Vitro*, App produce una matriz de exopolisacarido compuesta de un polímero de β -1,6-N-acetyl-D-glucosamina, llamada PGA. Este

polímero de la matriz de las biopelículas de App, también ha sido encontrado en biopelículas de bacterias como *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Este es el primer trabajo en el cual se muestra la bacteria biopelículas viable en agua de consumo proveniente de granjas porcícolas. Además, esta bacteria puede sobrevivir por un tiempo de por lo menos tres semanas en agua de consumo a una temperatura de 20°C, a nivel laboratorio (datos no mostrados). Por tal motivo con el uso de microscopia electrónica de barrido, en donde se observo biomasa proveniente de biopelículas y con los resultados de la Hibridación *in siui*, observó que App está asociada a estas biopelículas, aislándola del medio en donde se encuentra (agua de consumo). Así, la habilidad de este patógeno de sobrevivir en agua de consumo de granjas porcícolas, reside en la habilidad de formar biopelículas como en el caso de otras bacterias patógenas. Los resultados indican que App puede ser encontrada en agua de consumo y esto que su viabilidad es debido a la formación o asociación de biopelículas.

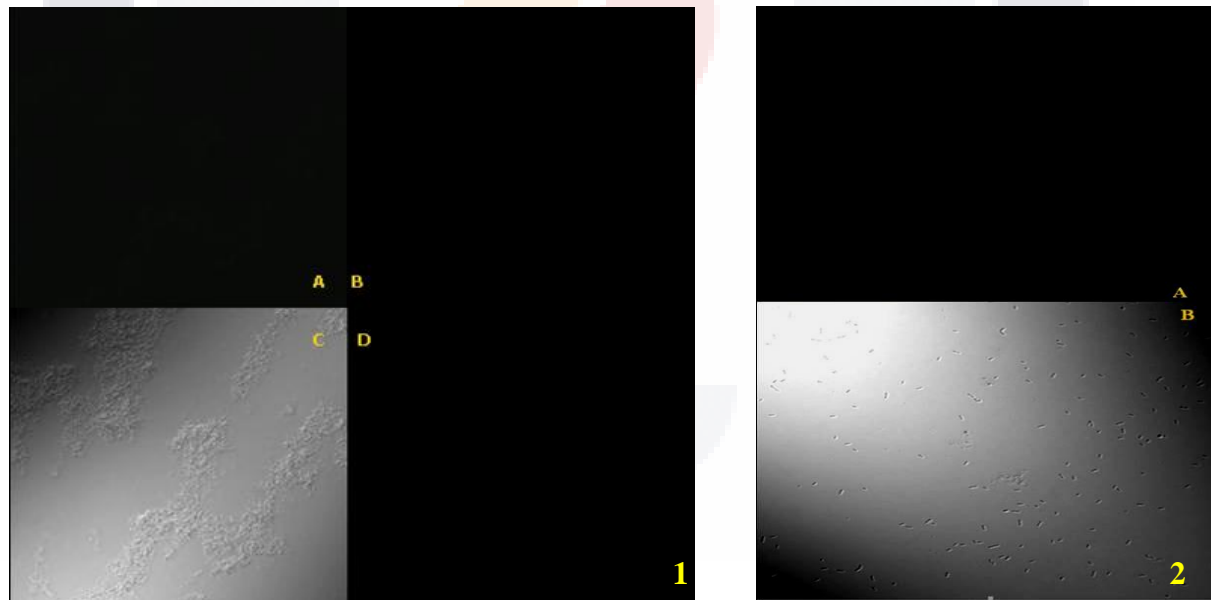


Fig. 43. 1) Control negativo de autofluorescencia en biopelículas de App (serotipo 5B), A) Longitud de onda para oligonucleótidos ApxIV marcado, B) Longitud de onda para WGA, C) Luz blanca donde se observa las bacterias en la biopelículas D) Merge. **2)** Control negativo en biopelículas de *B. bronchiseptica* (276), A) Longitud de onda para oligonucleótidos ApxIV marcado, B) Luz blanca donde se observa las bacterias en la biopelículas. Todas las imágenes 100X.

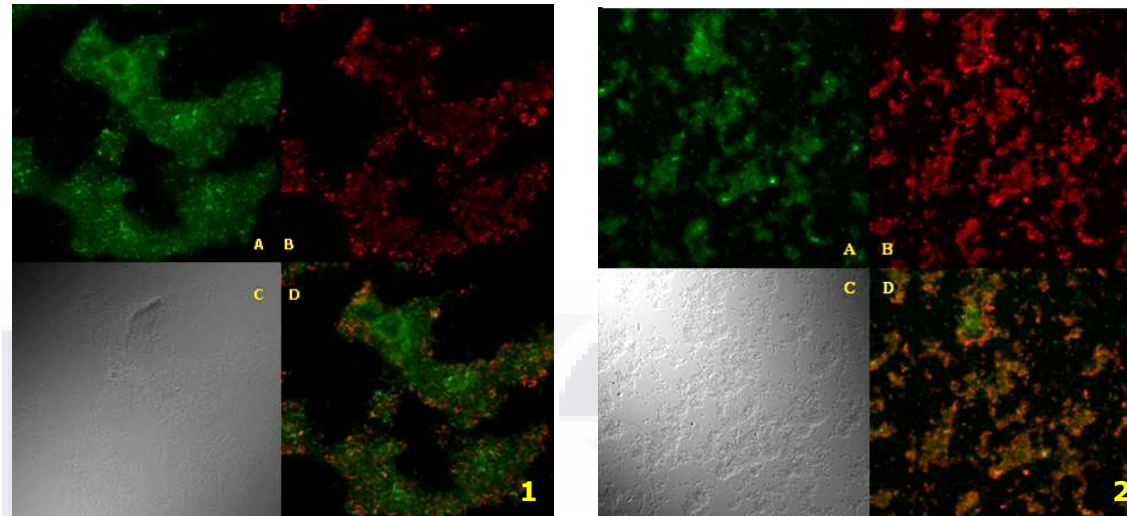


Fig. 44. 1) Biopelículas de App (serotipo 5B), A) Longitud de onda para oligonucleótidos ApxIV marcado, B) Longitud de onda para WGA, C) Luz blanca donde se observa las bacterias en la biopelículas D) Merge. **2)** Biopelículas de App 5B + *B. bronchiseptica* (276), A) Longitud de onda para oligonucleótidos ApxIV marcado, B) Longitud de onda para WGA, C) Luz blanca donde se observa las bacterias en la biopelículas D) Merge. Todas las imágenes 100X.

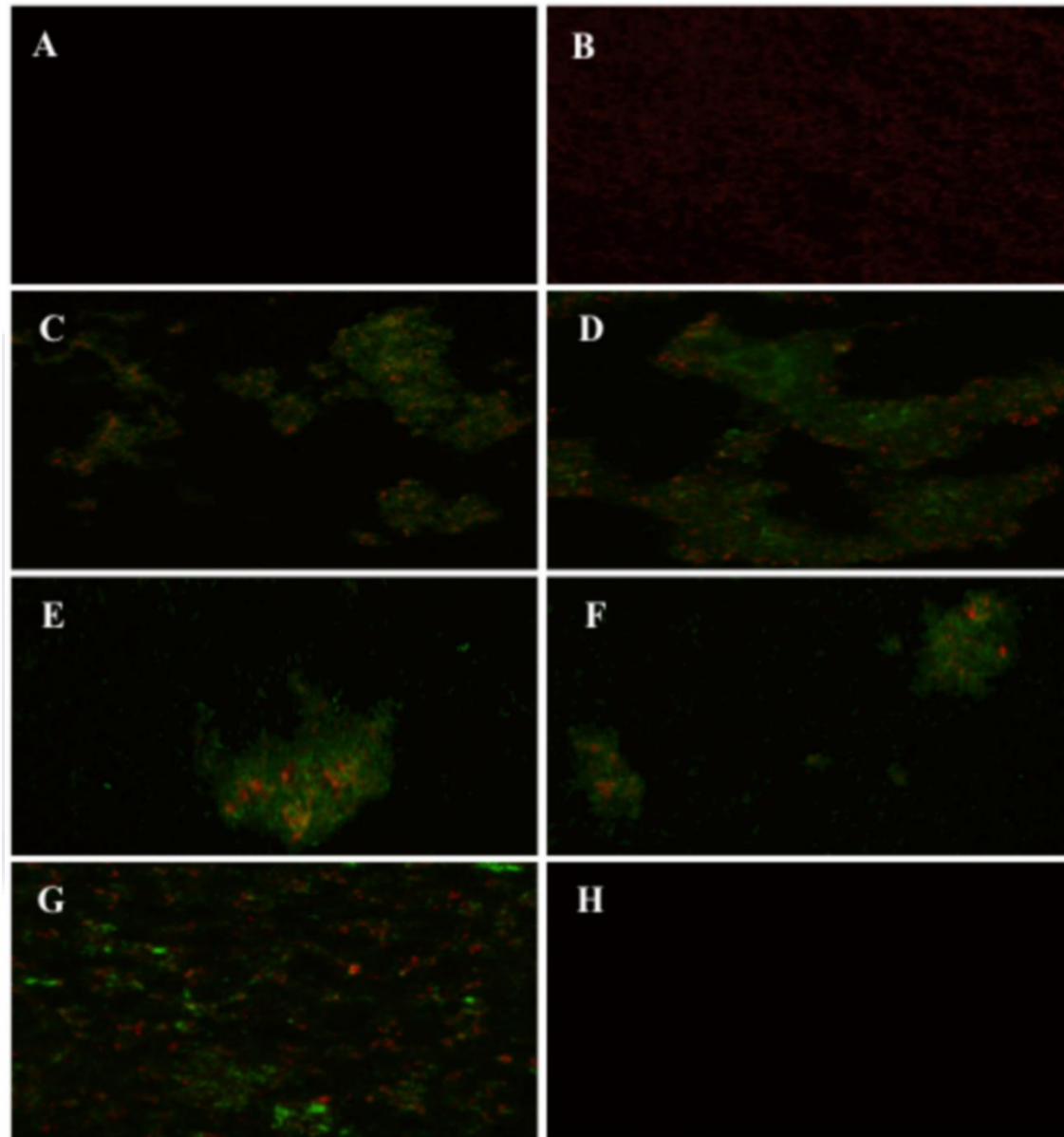


Fig. 45. Detección de App usando FISH en biopelículas aislados de agua de consumo de granjas porcícolas. **A)** Prueba de biopelículas de App sin fluorescencia. **B)** Prueba de fluorescencia en Biopelícula de *Escherichia coli*. **C)** Prueba de fluorescencia sobre biopeículas de App cepa S4074 **D)** Prueba de fluorescencia sobre biopeículas de App cepa L20. **E, F y G)** Pruebas de fluorescencia en agua de consumo de granjas porcícolas las cuales fueron positivas a PCR contra App. **H)** Pruebas sin fluorescencia en agua de consumo de granjas porcícolas las cuales fueron positivas a PCR contra App. (60X).



8- CONCLUSIONES

1. Se registró la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida* (toxigénica) en muestras de agua, alimento, suelo, aire y exudado nasal. Para estas bacterias aparentemente el ambiente de las granjas sirve de cómo reservorio y medio de dispersión en las piraras de las granjas. Además estas bacterias están presentes en el animal al encontrar muestras positivas en exudado nasal, lo cual incrementa la posibilidad de enfermedad respiratoria provocada por infecciones debidas a estos agentes patógenos.
2. Se demostró que *Actinobacillus pleuropneumoniae* se encuentra viable y cultivable en agua de consumo de las granjas porcícolas del Estado de Aguascalientes, lo cual sugiere que este patógeno puede usar este medio como reservorio y medio de dispersión de la enfermedad. Se necesitan realizar más estudios para probar que las cepas detectadas tienen poder infectivo en los animales.
3. Se demostró que *Actinobacillus pleuropneumoniae* se encuentra presente en biopelículas presentes en el agua de consumo de las granjas porcícolas del Estado de Aguascalientes, lo que sugiere que la bacteria usa esta estrategia para sobrevivir en condiciones adversas de crecimiento.
4. Con la metodología empleada en el presente trabajo no se lograron identificar *Streptococcus suis* ni *Hemophilus parasuis* en el ambiente de las granjas porcícolas de Aguascalientes. A pesar de que se han identificado en muestras de exudado nasal. Se deben realizar más estudios para descartar que el ambiente sirva como reservorio o medio de dispersión de estos agentes patógenos respiratorios, o bien determinar si su distribución varía a lo largo del año.
5. No se logró identificar la presencia del circovirus porcino tipo 2 en las muestras analizadas provenientes de exudado nasal o de muestras ambientales. No se lograron analizar todas las muestras, se deben de terminar de analizar y descartar la presencia de este virus en las granjas porcícolas del Estado de Aguascalientes.
6. Se estandarizaron las técnicas de PCR y RT-PCR para el virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino, virus de la influenza porcina y coronavirus respiratorio porcino. Se deben analizar todas las muestras obtenidas para descartar la presencia de este virus en las granjas porcícolas de Aguascalientes.



9- GLOSARIO

Absceso: Colección localizada de pus.

Ácidos nucleicos: Biomoléculas formadas por macropolímeros de nucleótidos. Están presentes en todas las células y constituye la base de la herencia que se transmite de una a otra generación. Existen dos tipos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).

Adenovirus: Virus con ADN desprovistos de cubierta. La mayoría atacan preferentemente las vías respiratorias aunque no son muchos los que resultan patógenos para el hombre.

ADN: (Ácido dextrirribonucleico) Ácido nucleico compuesto de dos cadenas polinucleotídicas que se disponen alrededor de un eje central formando una doble hélice, capaz de autorreplicarse y codificar la síntesis de ARN. Molécula bicatenaria formada por dos cadenas antiparalelas y complementarias entre sí. Formada por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. El ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN.

ADN desnudo: ADN desprovisto de cubierta proteínica o lipídica. Para la transferencia de genes, suele estar constituida por un plásmido bacteriano que contiene el gen a transferir. Se inyecta directamente en el tejido-diana donde se expresa generalmente sin integrarse en el genoma de las células huésped.

ADN recombinante: molécula de ADN formado por recombinación de fragmentos de ADN de orígenes diferentes. La (o las) proteína que codifica es una proteína recombinante. Se construye mediante la unión de un fragmento de ADN de origen diverso a un vector, como, por ejemplo, un plásmido circular bacteriano. El vector se abre por un sitio específico, se le inserta entonces el fragmento de ADN de origen diverso y se cierra el círculo de nuevo. El ADN recombinante se amplifica en una célula huésped en la que puede replicarse el vector.

Aerobio: Organismo que puede usar el O₂ en la respiración, algunos requieren O₂ para el crecimiento.

Amplificación: Un aumento del número de copias de un fragmento específico de ADN. Puede producirse in vivo o in vitro.

Anaerobio: Organismo que no puede usar el O₂ en la respiración y cuyo crecimiento puede ser inhibido por el O₂.

Antibiótico: Literalmente destructor de la vida. Término que comprende todas las sustancias antimicrobianas independientemente de su origen, ya sean derivadas de microorganismos (bacterias, mohos, hongos) de productos químicos sintéticos o de ingeniería genética.

Anticodon: Secuencia de tres nucleótidos en una molécula de ARNt que forma puentes de Hidrógeno con el triplete complementario (codon) de ARNm.

Anticuerpo: Proteínas producidas por las células del sistema inmune (linfocitos B) que se combinan específicamente con moléculas extrañas al organismo (antígenos) con la finalidad de inactivarlas.

Anticuerpo monoclonal: Anticuerpo monoclonado a partir del cultivo de un único tipo de células (un clon de hibridoma), y que contiene por tanto un sólo tipo de proteínas (inmunoglobulina).

Anticuerpos policlonales: Derivados de diferentes líneas de células B, los linfocitos encargados de la respuesta ante elementos ajenos (antígenos) mediante anticuerpos. Los anticuerpos policlonales son una mezcla de inmunoglobulina, secretados en contra de un antígeno específico, cada una reconociendo diferentes epitomo.

Antígeno: Moléculas, generalmente extrañas al organismo receptor, que inician la producción de anticuerpos, generalmente son proteínas o combinaciones de proteínas con polisacáridos.

Apoptosis: muerte celular programada, suicidio celular.

ARN: (ácido ribonucleico). Ácido nucleico formado por una cadena polinucleotídica. Su nucleótido, consiste en una molécula del azúcar ribosa, un grupo fosfato, y una de estas cuatro bases nitrogenadas: adenina, uracilo, citosina y guanina.

ARN de transferencia: Ácido ribonucleico, pequeño, de una sola cadena, pega al aminoácido y lo lleva al codón apropiado en el ARN m.

ARN mensajero: Molécula de ARN que representa una copia en negativo de las secuencias de aminoácidos de un gen. Las secuencias no codificantes (intrones) han sido ya extraídas. contiene la información genética procedente del ADN para utilizarse en la síntesis de proteínas, es decir, determina el orden en que se unirán los aminoácidos. El ARN mensajero es un ácido nucleico monocatenario.

ARN polimerasa: Enzima que sintetiza ARN en sentido 5'-3' usando una cadena de ADN antiparalela como templado.

ARN ribosómico: Componente estructural de los ribosomas. Es la parte principal de los ribosomas y posiblemente la clave del mecanismo de traducción de las proteínas.

ARNr 16S: Polinucleótido grande (1500 pb) que funciona como parte de la subunidad pequeña del ribosoma de los procariotas y de cuya secuencia puede obtenerse información evolutiva; el correlativo eucariota es el ARNr 18S

ARN satélites: ARN similar a los viroides empaquetados en cápsides de determinadas cepas de virus, se replican en presencia del virus "colaborador" específico, modificando su patogenicidad.

Bacilo: son bacterias que tienen forma de bastón, cuando se observan al microscopio.

Base nitrogenada: Molécula orgánica con características básicas derivada de la purina o de la pirimidina. Si deriva de la purina se denomina adenina (A) o guanina (G), y si deriva de la pirimidina, timina (T) o citosina (C). Forman parte de un nucleosido y de los ésteres fosfóricos de éstos (los nucleótidos) que conforman los ácidos nucleicos.

Bases apareadas: Dos bases nitrogenadas (adenina y timina o guanina y citosina) mantenidas juntas por enlaces débiles (puente hidrógeno). Las dos hebras del ADN se mantienen juntas formando una doble hélice por los enlaces de sus bases apareadas.

Biología Molecular: Parte de la biología que trata de los fenómenos biológicos a nivel molecular. En sentido restringido comprende la interpretación de dichos fenómenos sobre la base de la participación de las biomoléculas proteínas y ácidos nucleicos.

Biopelícula: Colonias de células microbianas cubiertas o embebidas en sustancia mucosa y adheridas a una superficie.

Cápside: Cubierta de proteína de una partícula viral libre.

Cápsula: Estructura que rodea a ciertas bacterias.

Cebador: (primer), Cadena polinucleotídica corta a la cual se agregan nuevos desoxirribonucleótidos por acción de la ADN polimerasa.

Célula: La más pequeña unidad estructural de los seres vivos capaz de funcionar independientemente. Unidad de estructura y funcional de plantas y animales que consta típicamente de una masa de citoplasma que encierra un núcleo (excepto en procariotas) y limitada por una membrana diferencialmente permeable. Es la unidad viva más simple que se reproduce por división.

Cepa: En microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Clase: Subcategoría taxonómica de los phyla

Clonación molecular: Propagación de una molécula a través de su replicación repetida para obtener una población de moléculas idénticas a la primera. Constituye el procedimiento central de las técnicas de ADN recombinante.

Coco: Tiene forma más o menos esférica, ninguna de sus dimensiones predomina claramente sobre las otras.

Código del triplete: Sucesión de tres bases de tres nucleótidos en la molécula de ADN que cifra un aminoácido.

Código Genético: Código cifrado por la disposición de nucleótidos en la cadena polinucleótida de un cromosoma que rige la expresión de la información genética en proteínas, es decir, la sucesión de aminoácidos en la cadena polipeptídica. La información sobre todas las características determinadas genéticamente en los seres vivos genética está almacenada en el ADN y cifrada mediante las 4 bases nitrogenadas. Cada sucesión adyacente de tres bases (codón) rige la inserción de un aminoácido específico. En el ARN la timina es sustituida por uracilo. La información se transmite de una generación a otra mediante la producción de réplicas exactas del código.

Codón: Secuencia de tres nucleótidos consecutivos en un gen o molécula de ARNm determinada por sus bases nitrogenadas, que especificará la posición de un aminoácido en una proteína.

Coenzima: Molécula o cofactor no proteico que colabora con la enzima en su función catalítica, con frecuencia actúan en reacciones de oxido-reducción.

Doble hélice: La forma que toman las dos hebras de ADN cuando se encuentran unidas.

Endonucleasa: Enzima que corta una molécula de ADN en un sitio interno de la secuencia de nucleotídica.

Endonucleasa de restricción: Enzima que reconoce específicamente determinadas secuencias y corta a la molécula de ADN en ese sitio. De las bacterias se obtuvieron más de 400 enzimas que reconocen más de 150 diferentes secuencias de ADN (sitios de corte por enzimas de restricción).

Endotoxina: Fracción del lipopolisacarido de la pared celular de algunas bacterias Gram negativas, que al solubilizarse actúa como toxina.

Enzima: Proteína con actividad catalítica, es decir; que acelera una reacción química específica sin destruirse en el proceso. Las moléculas blanco de una enzima se denominan sustratos.

Epitelio: Tipo especializado de tejido que normalmente recubre las superficies y cavidades del cuerpo.

Especie: Clasificación taxonómica formada por el conjunto de poblaciones naturales que pueden hibridarse entre sí real o potencialmente. Es decir, que se determina de forma empírica: dos individuos pertenecen a la misma especie si pueden generar descendencia reproducible; en caso contrario son de especies diferentes.

Eucarionte: Organismo con núcleo organizado y cromosomas. Forma parte de un gran grupo que difiere de los procariontes (las bacterias y organismos similares) que carecen de núcleo. Existen diferencias fundamentales entre la organización genética de uno y otro grupo.

Exotoxina: Proteína liberada por un organismo durante el crecimiento y que posee efectos tóxicos para la célula hospedadora.

Exudado: Líquido intersticial proteináceo con densidad (>1,040) con o sin leucocitos, proveniente de vasos locales lesionados

Fenotipo: Se refiere a la manifestación observable de un determinado genotipo. A un genotipo corresponde un fenotipo. Por ejemplo, a la presencia de un gene productor de mucha melanina (genotipo), corresponde una coloración oscura de la piel (fenotipo).

Fiebre: Aumento de la temperatura corporal por encima de lo normal.

Fómites: Objetos inanimados que si se contagian con un patógeno viable, pueden transmitir el patógeno al hospedador.

Gen: Unidad física y funcional del material hereditario que determina un caracter del individuo y que se transmite de generación en generación. Su base material la constituye una porción de cromosoma (locus) que codifica la información mediante secuencias de ADN.

Género: Subcategoría taxonómica dentro de la Familia, se compone de uno o más especies. Especies que comparte una o más propiedades.

Genes anidados: Genes situados dentro de los intrones de otros genes en los genomas eucariotas. Los genes anidados pueden a su vez contener o no intrones. En este último caso, posiblemente sean copias retrotranscritas de algún gen. Constituyen cerca del 6 % del genoma humano.

Genética: Ciencia que trata de la reproducción, herencia, variación y del conjunto de fenómenos y problemas relativos a la descendencia.

Genoma: Conjunto de todos los genes de un organismo, de todo el patrimonio genético almacenado en el conjunto de su ADN o de sus cromosomas. Conjunto de genes compartidos por los miembros de una unidad reproductiva tales como una población o especie. Todo el material genético de los cromosomas de un organismo en particular, su tamaño se da generalmente como el número total de bases apareadas.

Genotipo: Se usa para denominar al componente genético de un determinado individuo o variedad. Se refiere, en última instancia a la secuencia de su genoma. Su contraparte es el fenotipo.

Gram negativa: Tipo de célula procariota cuya pared celular que contiene poco peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta de lipopolisacárido, lipoproteína y otras moléculas compuestas.

Gram positiva: Tipo de célula procariota cuya pared celular esta compuesta básicamente por peptidoglicano y que carece de membrana externa.

Hibridación: Aplicado a los ácidos nucleicos, significa su capacidad de encontrar o asociarse a la hebra opuesta o complementaria.

Hibridación "in situ": El uso de sondas de ADN o ARN para detectar la presencia de secuencias de ADN complementarias a ellas, en bacterias clonadas o células eucariotas cultivadas.

Ictericia: Exceso y liberación de bilirrubinas en el hígado debido a la destrucción de hepatocitos.

In situ: Referido a conservación de recursos genéticos, la que se realiza en su medio natural, y que para las especies domesticadas se verifica en el medio donde desarrollaron sus propiedades distintivas

In vitro: condiciones experimentales en las que no existen células u organismos vivos. Condiciones dadas en portaobjetos microscópicos, tubos de ensayo, etcétera

Infección: Invasión de un ser vivo por un agente patógeno que desencadena una enfermedad.

Intrón: Secuencia de bases de ADN que interrumpe la secuencia de un gen que codifica para una proteína, esta secuencia se transcribe al ARNm pero en un proceso de "corte y empalme" se separa del mismo antes que el ARN

Kilobase (Kb): Unidad empleada para medir la longitud de los fragmentos de ADN constituidos por una serie de bases. 1 Kb = 1.000 bases.

Lisozima: Descubierta por sir Alexander Fleming en 1922, enzima que rompe el enlace beta glucosídico de la mureína. Se la encuentra en el líquido lagrimal, secreciones nasales y en la clara de huevo. También se la ha aislado de bacterias y bacteriófagos.

Material genético: Todo material de origen vegetal, animal, microbiano o de otro tipo que contenga unidades funcionales de la herencia.

Medio de cultivo: Solución acuosa con varios nutrientes que permite el crecimiento de microorganismos.

Microorganismo: Organismo microscópico constituido por una célula, incluyendo los virus.

Molécula: Conjunto de átomos unidos unos con otros por enlaces fuertes. Es la expresión mínima de un compuesto o sustancia química.

Mutagénesis: Proceso por el cual se inducen cambios en el material genético de un organismo. El proceso puede ser espontáneo o inducido.

Nucleasa: Cualquier enzima que hidroliza los enlaces éster de los ácidos nucleicos. Se clasifica a su vez en endonucleasa o exonucleasa, según la posición del enlace fosfodiéster que hidroliza, y en ribonucleasa o desoxirribonucleasa, según el ácido nucleico que sirva de sustrato. Existen nucleasas que reconocen específicamente los ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios e incluso las hélices híbridas de ADN y ARN.

Nucleósido: Compuesto orgánico constituido por una base nitrogenada (púrica, derivada de la purina, o pirimidínica, derivada de la pirimidina) enlazada mediante el nitrógeno 1 de la pirimidina o el nitrógeno 9 de la purina al carbono 1 de una 2-desoxi-D-ribose o de una D-ribose a través de un enlace N-glucosídico de configuración β . Según que el azúcar sea la ribosa o la desoxirribosa, el nucleósido resultante se denomina ribonucleósido (ribonucleoside) o desoxirribonucleósido (deoxyribonucleoside). Los nucleósidos más comunes de los sistemas biológicos son la adenosina, la guanosina, la citidina y la uridina (que contienen una ribosa) y la dexosiadenosina, la desoxiguanosina, la desoxicitidina y la timidina (que contienen una dexosirribosa).

Nucleótido: Éster fosfórico de un nucleósido. Consta de uno o más grupos fosforilo que esterifican el grupo hidroxilo en las posiciones 3' o 5' (con mayor frecuencia) del azúcar correspondiente (ribosa o desoxirribosa). Los fosforilos se clasifican en grupos fosfatos α , β o γ con arreglo a su proximidad al azúcar. Según que el azúcar sea la ribosa o la desoxirribosa, el nucleótido resultante se denomina ribonucleótido o desoxirribonucleótido. La base nitrogenada es la portadora de la información genética, mientras que los grupos fosfato y los azúcares desempeñan una función

estructural. Los ribonucleótidos de las células de los organismos son el ácido adenílico, el ácido guanílico, el ácido uridílico, el ácido citidílico, y los desoxirribonucleótidos el ácido desoxirriboadenílico, el ácido desoxirriboguanílico, el ácido desoxirribocitidílico y el ácido timidílico.

Cepa silvestre: Variedad natural de un determinado organismo. Su contraparte es una cepa mutante que contiene lesiones particulares en su genoma.

Operador: Segmento especial del ADN adyacente al promotor que forma parte de la región controladora de la transcripción de un operón. El operador interacciona con la proteína represora regulando de esta manera el proceso de la transcripción sincronizada del operón correspondiente.

Operón: Conjunto del gen operador con los genes estructurales que controla, localizados uno tras otro en el cromosoma bacteriano, se transcriben juntos, las proteínas sintetizadas pertenecen a una misma vía metabólica

Organelo: Estructura intracelular especializada en una función determinada, como el núcleo, las mitocondrias, los cloroplastos, los ribosomas, etc

Parásitos: Organismos que viven dentro o sobre otro organismo. Los parásitos se benefician de esta asociación, perjudicando a su huésped.

Patogenicidad: Capacidad de un parasito de causar daño en su hospedador..

Patógeno: Organismo capaz de causar una enfermedad.

PCR anidado o interno: Técnica que comporta dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) sucesivas, con dos pares de cebadores o primers distintos, de tal modo que los cebadores utilizados en el segundo PCR (internal o nested PCR) flanqueen una región genómica amplificada en la primera reacción en cadena (external PCR). El método de PCR anidado se utiliza sobre todo cuando se tienen pequeñas cantidades del ADN de interés o cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas que a veces se observan con el PCR clásico, dado que en cada etapa se realiza un número menor de ciclos. Además, si el producto del primer PCR es el resultado de una amplificación inespecífica, el segundo par de cebadores internos no reconocerá la secuencia complementaria, y por consiguiente no habrá amplificación.

PCR: (de las iniciales en inglés Polimerase Chain Reaction): Método de amplificación de una secuencia de bases del ADN, ideado por Mullis, usando una polimerasa termoestable y dos cebadores (primers) a ser amplificada, uno complementario de la secuencia inicial de la hebra (+) y otro de la otra secuencia final de la hebra (-). En razón que las nuevas cadenas de ADN sintetizadas pueden subsecuentemente servir de moldes adicionales para la misma secuencia de cebadores, sucesivos "ciclos" de anillado de cebadores, alargamiento de la cadena y disociación del ADN bicatenario formado producen rápidamente grandes cantidades de la secuencia original (amplificación). El PCR puede utilizarse para detectar una secuencia definida en una muestra de ADN.

PCR Mutiplex: Variante de la técnica de PCR donde se emplean dos o más pares de primers en único recipiente con el fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN.

Plásmido: ADN bicatenario circular y autoreplicante, que se encuentra a menudo en las células bacterianas. Se lo utiliza como vector en tecnología del ADN recombinante. Los plásmidos son de replicación autónoma y portan entre 2 y 30 genes. Algunos tienen la capacidad para "entrar y salir" del cromosoma bacteriano.

Polímero: Compuesto químico formado por la combinación de unidades estructurales repetidas (monómero) o cadenas lineales de la misma molécula.

Proteasa: Enzima que degrada proteínas por hidrólisis.

Proteína: Sustancia bioquímica constituida por una hebra o cadena lineal de unidades llamadas aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de una proteína determina su estructura y su función. Las proteínas son los productos primarios codificados por los genes, encargadas de organizar la actividad bioquímica celular.

Replicación: Proceso por el cual las moléculas de ADN se duplican, generando dos copias iguales a partir de una sola. El proceso requiere la separación de las dos hebras de la molécula original.

Reservorio: Sitio en que permanecen los agentes infecciosos viables y a partir de los cuales puede ocurrir una infección.

Retrovirus: Virus cuyo genoma está constituido por ARN monocatenario, que es transcrito de forma inversa en ADN durante su infección y replicación. La copia de ADN se integra en el ADN cromosómico del huésped.

Ribosoma: Organelo encargado de manufacturar proteínas, de acuerdo con las instrucciones del ADN (presentes en el ARN mensajero). Es un agregado de proteínas y ARN ribosomal.

Síndrome me Shock tóxico (TSS): Shock sistémico agudo que se produce por parte del sistema inmune como respuesta a la exotoxina de *Staphylococcus aureus*.

Sonda de hibridación: Segmento de ácido nucleico (ADN o ARN) que por sus propiedades de asociación con la secuencia complementaria, se utiliza para detectar su presencia en una muestra.

Toxina: Proteína responsable de la especificidad funcional de ciertas bacterias, que es venenosa para determinados organismos

Traducción: Proceso por medio del cual se lee la secuencia de codones del ARN y se elabora una cadena de proteína, con la secuencia correspondiente, de acuerdo con el código genético.

Transcripción: Proceso por el que un gene se expresa mediante la síntesis de un ARN que contiene la misma secuencia del gen.

Transcripción inversa: Proceso de síntesis de ADN complementario a partir del ARN genómico de los retrovirus efectuado por la enzima transcriptasa inversa.

Transcriptasa reversa: Enzima utilizada para su replicación por los retrovirus; copia el ARN del retrovirus en una hebra complementaria de ADN.

Transducción de señal: Proceso por el cual una señal molecular (por ejemplo, la presencia de una hormona en el medio extracelular) es convertida en una respuesta (por ejemplo, generación de un compuesto en el medio intracelular). Esta respuesta puede ser después amplificada o atenuada y, a su vez, dar origen a otro evento de transducción de señal.

Vehículo: Fuente inanimada de patógenos que infecta a gran número de individuos. Vehículos comunes son el agua y el alimento.

Virus: Agente infeccioso de naturaleza obligatoriamente intracelular para sintetizar su material genético. Constan de un ácido nucleico (ADN o ARN) y un recubrimiento proteico. Entidad no celular, de muy pequeño tamaño. En estado extracelular son inertes.



104 BIBLIOGRAFÍA



1. **Abbas**, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S., 2008, *Inmunología celular y molecular*, 6ª edición, Editorial ELSEVIER, Barcelona, 514 pp.
2. **Ahuja**, U. Liu, M. Tomida, S. Park, J. Souda, P. Whitelegge, J. Li, H. Harvill, E.T. Parkhill, J. & Miller, J.F. 2012. Phenotypic and genomic analysis of hypervirulent human-associated *Bordetella bronchiseptica*. *BMC Microbiol.* 6; 12, 167.
3. **Alarcon**, P., Rushton, J., Nathues, H. & Wieland, B. 2013. Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms. *Prev Vet Med.* 12: 412-416.
4. **Álvarez-Fletes**, M., Rodríguez-Buenfil, J. C., Ciprián- Carrasco, A., Rodríguez-Guzmán, L., Ayora-Tavera, G. & Segura-Correa, J. C., 2004, Serological profile of Porcine Influenza virus, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in farms of Yucatan, México, *Vet. Mex.*, 35:4:295-305.
5. **Angen**, Ø., Oliveira, S., Ahrens, P., Svensmark, B. & Leser, T. D., 2007, Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*, *Veterinary Microbiology*, 119:266–276.
6. **Aragón**, V., 2008, <http://www.3tres3.com> (Diagnostico Clínico y Patológico, CRESA, España).
7. **Aragon**, V., Bouchet, B. & Gottschalk, M., 2009, Invasion of endothelial cells by systemic and nasal strains of *Haemophilus parasuis*, *The Veterinary Journal*, In press.
8. **Araque**, H., 2009, Sistema de producción de cerdos, Instituto y departamento de producción animal, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía.
9. **Arceo**, M.E. et al., 2012. Characterizing differential individual response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection through statistical and functional analysis of gene expression. *Front Genet.* 3:321.
10. **Arias**, M., Barceló, J., Muñoz, A. & Sánchez- Vizcaíno, 2009 <http://www.sanidadanimal.info> (Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas), España.
11. **Arias**, M., Segalés, J., Domingo, M. & Sánchez-Vizcaíno, J. M., 2009, <http://www.sanidadanimal.info.com> (Universidad Complutense de Madrid, España).
12. **Arunachalam**, R. Paulkumar, K. & Annadurai, G. 2013. Genetic ancestor of external antigens of pandemic influenza A/H1N1 virus. *Interdiscip Sci.* 4: 4, 282-290.
13. **Auger**, E., Deslandes, V., Ramjeet, M., Contreras, I., Nash, J. H. E. Harel, J., Gottschalk, M., Olivier, M. & Jacques, M., 2009, Host Pathogen Interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with Porcine Lung and Tracheal Epithelial Cells, *Infection and immunity*, 77:4:1426–1441.
14. **Bálint**, A., Tenk, M., Deim, Z., Rasmussen, T. B., Uttenthal, A., Cságola, A., Tuboly, T., Farsang, A., Fossum, C., Timmusk, S., Berg, M. & Belák, S., 2009, Development of primer-probe energy transfer real-time PCR for the detection and quantification of porcine Circovirus type 2, *Acta Veterinaria Hungarica*, 57:3:441–452.
15. **Baum** M. M., Kainović, A., O'Keeffe, T., Pandita, R., McDonald, K., Wu, S. & Webster, P., 2009, Characterization of structures in biofilms formed by a *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 9:103-109.
16. **Bautista –Villalpando**, C.A. Maestría Interinstitucional en Ciencias Morfológicas. Proyecto: Distribución de actina

en la infección crónica de pleuroneumonía porcina. Culminada 9 de enero de 2009.

17. **Bavanthasivam J.et al.**, 2012. Proximity-dependent inhibition of growth of *Mannheimia haemolytica* by *Pasteurella multocida*. *Appl Environ Microbiol.*78:18. 6683-6688.
18. **BD**, 2009, www.bd.com (Becton, Dickinson and Company).
19. **Bentley, S.**, Sebaihia, M. & Crossman, L., 2005, Enemies within, *Nature Reviews Microbiology*, 3:1-2.
20. **Bethe, A.**, Wieler, L. H., Selbitz, H. J. & Ewers, C., 2009, Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine, *Veterinary Microbiology*, 139:97-105.
21. **Blanco, I.**, Canals, A., Evans, G., Mellencamp, M. A., Cia, C., Deeb, N., Wang, L. & Galina-Pantoja, L., 2008, Differences in susceptibility to *Haemophilus parasuis* infection in pigs, *The Canadian Journal of Veterinary Research*,72:228-235.
22. **Boehringer Ingelheim**, 2009 <http://www.bi-vetmedica.com.mx> (Ingelvac® PRRS, MLV y el síndrome reproductor y respiratorio porcino).
23. **Boehringer Ingelheim**, 2010, <http://www.ingelvacdart.com>
24. **Boulos, L.**, Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J. & Desjardins, R., 1999, LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water, *J. Microbiol. Meth.*, 37:77-86.
25. **Bradford, M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72:248-254.
26. **Brockmeier, S. L.**, Halbur, P. & Thacker, E., 2002, Porcine Respiratory Disease Complex, ASM Press, E.U.A., 231-258.
27. **Brockmeier, S. L.**, Loving, C. L., Nicholson, T. L. & Palmer, M. V., 2008, Coinfection of pigs with porcine respiratory Coronavirus and *Bordetella bronchiseptica*, *Veterinary Microbiology*, 128:36-47.
28. **Buboltz, A. M.**, Nicholson, T. L., Weyrich, L. S., & Harvill, E. T., 2009, Role of the type III secretion system in a hypervirulent lineage of *Bordetella bronchiseptica*, *Infection and Immunity*, 77:9:3969-3977.
29. **Burgos, J. M.**, King-Lyons, N. D. & Connell, T. D., 2010, Expression of BfrH, a putative siderophore receptor of *Bordetella bronchiseptica*, is regulated by iron, Fur1, and the extracellular function (ECF) sigma factor EcfI, *Infect and Immun*, in press.
30. **Cai, H. Y.**, van Dreumel, T., McEwen, B., Hornby, G., Bell-Rogers, P., McRaid, P., Josephson, G. & Maxie, G., 2007, Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19:91-95.
31. **Calsamiglia, M.**, Pijoan, C. & Trigo, A., 1999, Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11:246-251.
32. **Chae, C.**, Kim, O., Min, K., Choi, C., Kim, J. & Cho, W. S., 2000, Seroprevalence of porcine respiratory coronavirus in selected Korean pigs, *Preventive Veterinary Medicine*, 46:293-296.
33. **Chavez, E.**, 2010, <http://www.engormix.com> (Community of international business related to animal production).

34. **Chen, C.**, Cui, S., Zhang, C., Li, J. & Wang, J., 2010, Development & validation of reverse transcription loopmediated isothermal amplification for detection of PRRSV, *Virus Genes*, 40:76–83.
35. **Chen, H.**, Li, C., Fang, M., Zhu, M., Li, X., Zhou, R., Li, K. & Zhao, S., 2009, Understanding *Haemophilus parasuis* infection in porcine Spleen through a transcriptomics approach, *BMC Genomics*, 10:64:1-18.
36. **Chen, N. H.**, Chen, X. Z., Hu, D. M., Yu, X. L., Wang, L. L., Han, W., Wu, J. J., Cao, Z., Wang, C. B., Zhang, Q., Wang, B. Y. & Tian, Q. G., 2009, Rapid differential detection of classical and highly pathogenic North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China by a duplex real-time RT-PCR, *Journal of Virological Methods*, 161:192–198.
37. **Chen, Q.**, Li, J., Deng, Z., Xiong, W., Wang, Q. & Hu, Y.Q., 2010, Comprehensive detection and identification of seven animal coronaviruses and human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay, *Intervirology*, 53:95–104.
38. **Chege G.**, Warren R., Van Pittius N., Burgers W., Wilkinson R., Shephard E., Williamson A. 2008. Detection of natural infection with *Mycobacterium intracellulare* in healthy wild-caught Chacma baboons (*Papio ursinus*) by ESAT-6 and CFP-10 IFN-gamma ELISPOT tests following a tuberculosis outbreak. *BMC Microbiol.* 7-8:27.
39. **Chieh, Y.**, et al. 2012. The effect of infection order of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on dually infected swine alveolar macrophages. *BMC Veterinary Research*, 8:174.
40. **Choi, Y. K.**, Goyal, S. M. & Joo, H. S., 2002, Evaluation of a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay for subtyping hemagglutinin genes 1 and 3 of swine influenza type A virus in clinical samples, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 14:62–65.
41. **Choi, Y. K.**, Goyal, S. M., Kang, S. W., Farnham, M. W. & Joo, H.S., 2002, Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays, *Journal of Virological Methods*, 102:53–59.
42. **Chomnawang, M. T.**, Nabnuengsap, J., Kittiworakarn, J. & Pathanasophon, P., 2009, Expression and Immunoprotective Property of a 39-kDa PlpB Protein of *Pasteurella multocida*, *J. Vet. Med. Sci.* 71:11:1479–1485.
43. **Cochran, W. G.** 1977. Sampling techniques. 3rd edition. Willey and Sons, N. Y.
44. **Cornejo- Amador M. G. C** Maestría de la Med. Cir. Maestria Interinstitucional en Ciencias Morfológicas. Proyecto: Descripción del daño estructural pulmonar en cerdos portadores crónicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Culminada 12 de enero de 2007.
45. **Cortey, M.**, Pileri, E., Sibila, M., Pujols, J., Balasch, M., Plana, J. & Segalés, J., 2010, Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008, *The Veterinary Journal*, In press.
46. **Costantini, V.**, Lewis, P., Alsop, J., Templeton, C. & Saif, L. J., 2004, Respiratory and fecal shedding of Porcine respiratory coronavirus (PRCV) in sentinel weaned pigs and sequence of the partial S-gene of the PRCV isolates, *Arch. Virol.*, 149:957–974.
47. **Deblanc C.**, et al., 2013, Pre-infection of pigs with *Mycoplasma hyopneumoniae* induces oxidative stress that influences outcomes of a subsequent infection with a swine influenza virus of H1N1 subtype. *Vet Microbiol.* 23;162, 643-651

48. **Dee, S.**, Otake, S., Oliveira, S. & Deen, J., 2009, Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Vet. Res* 40:39:1-13.
49. **Del Rio, M. L.**, Navas-Mendez, J., Gutierrez-Martin, C. B., Rodriguez-Barbosa, J. I. & Rodriguez-Ferri, E. F., 2005, Identification of sulI allele of dihydropteroate synthase by representational difference analysis in *Haemophilus parasuis* serovar 2, *Letters in Applied Microbiology*, 40:436-442.
50. **Díaz, I.**, Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., & Mateu, E., Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Journal of General Virology*, 2005, 86:1943-1951
51. **Drexler, C. S.**, Witvliet, M. H., Raes, H., van de Laar, M., Eggen, A. A. S. & Thacker, E. L., 2010, Efficacy of combined porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in piglets, *Veterinary Record*, 16:1-5.
52. **Dyce, K.**, Sack, W. & Wensing, C., 1999, Anatomía Veterinaria, 2^{da} edición, Editorial McGraw- Hill Interamericana, México, 951 pp.
53. **Elizondo-Barrón, J.**, Pecina- Quintero, V. & Rodríguez-del Bosque, L. A., 2004, Manual para el diagnostico de patógenos en lácteos y carnes mediante PCR, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 30-50pp.
54. **Enríquez- Verdugo, I.**, Godínez- Vargas, D., Martínez- Zuniga, R., Serrano- Luna, J.J., de la Garza, M., Hamer- Barrera, R. & Guerrero- Barrera, A.L., 2003, Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a componentes de matriz extracelular de cerdo, *Ciencia Veterinaria*, 9: 4:269-293.
55. **Erles, K.** & Brownlie, J., 2009, Expression of b-defensins in the canine respiratory tract and antimicrobial activity against *Bordetella bronchiseptica*, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, In press.
56. **Ewers, C.**, Lübke-Becker, A., Bethe, A., Kiebling, S., Filter, M. & Wieler, L.H., 2006, Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status *Veterinary Microbiology*, 114:304-317.
57. **Fablet, C.**, Marois, C., Kobisch, M., Madec, F. & Rose, N., 2009, Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach, *Veterinary Microbiology*, in press.
58. **FAOSTAT**, 2010 <http://www.faostat.fao.org>, Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.
59. **Feng, Y.**, Zhang, H., Ma, Y. & Gao, J. F., 2010, Uncovering newly emerging variants of *Streptococcus suis*, an important zoonotic agent, *Trends in Microbiology*, 30:10:1-8.
60. **Feng, Z. X.**, Shao, G. Q., Liu, M. J., Wang, H. Y., Gan, Y. & Wu, X. S., 2009, Development and validation of a SIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, *Veterinary Microbiology*, in press.
61. **Fittipaldi, N.**, Takamatsu, D., Domínguez-Punaro, M. C., Lecours, M. P., Montpetit, D., Osaka, M., Sekizaki, T. & Gottschalk, M., 2010, Mutations in the gene encoding the ancillary pilin subunit of the *Streptococcus suis* srtf cluster result in pili formed by the major subunit only. *PLoS ONE*, 5:1:e8426.

62. **Fittipaldi, N.**, Segura, M., Grenier, D. & Gottschalk, M. 2012. Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. *Future Microbiol*, 7:2, 259-279.
63. **Frاندoloso, R.**, Martinez-Martinez, S. Gutierrez-Marti, C. & Rodriguez-Ferri, E. 2012. *Haemophilus parasuis* serovar 5 Nagasaki strain adheres and invades PK-15 cells. *Veterinary Microbiology*. 154; 347–352
64. **Frey, J.** 2003, Detection, identification, and cubtyping of Actinobacillus pleuropneumoniae. Methods in Molecular Biology. 216: PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. Edited by: K. Sachse and J. Frey. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
65. **Gagnon, C. A.**, Music, N., Fontaine, G., Tremblay, D. & Harel, J., 2010, Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): A type 1 and type 2 PCV recombinant, *Veterinary Microbiology*, In press.
66. **Gagnon, C. A.**, Tremblay, D., Tijssen, P., Venne, M. H., Houde, A. & Elah S.M., 2007, The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada, *Canadian Veterinary Journal*, 48:811-819.
67. **Galeziok, M.**, Roberts, I. & Passalacqua, J., 2009, *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a man with acquired immunodeficiency syndrome: a case report, *Journal of Medical Case Reports*, 3:76:1-3.
68. **Garibaldi, M.**, Rodríguez-Ortega, M. J., Mandanici, F., Cardaci, A., Midiri, A., Papasergi, S., Gambadorod, O., Cavallari, V., Teti, G. & Beninati, C., 2010, Immunoprotective activities of a *Streptococcus suis* pilus subunit in murine models of infection, *Vaccine*, doi:10.1016/j.vaccine. In Press.
69. **Grasteau, A.**, Tremblay, Y. D., Labrie, J. & Jacques, M. 2011. Novel genes associated with biofilm formation on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 153,134-143.
70. **Greiser-Wilke, I.**, Fiebig, K., Drexler, C.& Beilage, E. G., 2009, Genetic diversity of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in selected herds in a pig-dense region of North-Western Germany, *Veterinary Microbiology*, in press
71. **Gu, H.**, Zhu, H. & Lu, C., 2009, Use of in vivo-induced antigen technology (IVIAT) for the identification of *Streptococcus suis* serotype 2 in vivo-induced bacterial protein antigens, *BMC Microbiology*, 9:201:1-15.
72. **Guerrero-Barrera, A. L.**, De la Garza, M., Mondragón, R. García-Cuéllar, C. & Segura-Nieto, M. 1999, Actin-related proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their interactions with actin-binding proteins, *Microbiology*, 145: 3235- 3244.
73. **Ha, Y.**, Shin, J. H. & Chae, C., 2010, Colostral transmission of porcine circovirus 2 (PCV2): reproduction of PMWS in 4 pigs feeding milk from PCV2-infected sow and postnatal porcine parvovirus 5 infection or immunostimulation, *Journal of General Virology*, In press.
74. **Halbur, P. G.**, Paul, P. S., Meng, X. J., Lum, M. A., Andrews, J. J. & Rathje, J. A., 1996, Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model, *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:11-20.
75. **Halloy, D. J.**, Kirschvink, N. A., Mainil, J. & Gustin, P.G., 2005, Synergistic action of *E. coli* endotoxin and *Pasteurella multocida* type A for the induction of bronchopneumonia in pigs, *The Veterinary Journal*, 169:417–426.
76. **Hamel, A. L.**, Lihua L. L., Sachvie, C., Grudeski, E. & Nayar, G. P. S., 2000, PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 64:44-52.

77. **Han, X.** & Lu, C., 2009, Biological activity and identification of a peptide inhibitor of LuxS from *Streptococcus suis* serotype 2, *FEMS Microbiol Lett*, 294:16–23.
78. **Han, X.G.** & Lu, C. P., 2009, Detection of autoinducer-2 and analysis of the profile of luxS and pfs transcription in *Streptococcus suis* serotype 2, *Curr Microbiol*, 58:146–152.
79. **Hansen, M. S.,** Hjulsager, C. K., Bille-Hansen, V., Haugegaard, S., Dupont, K., Høgedal, P., Kunstmann, L. & Larsen, L. E., 2010, Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine Circovirus type 2 associated reproductive failures, *Veterinary Microbiology*, In press.
80. **Harold E.** & Lane D. 1998, Antibodies a laboratory manual, New York, Cold Spring Harbord, 61-67.
81. **Harper, M.,** Boyce, J. D. & Adler, B., 2006, *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur, *FEMS Microbiol Lett*, 265:1–10.
82. **Hermann, J. R.,** Brockmeier, S. L., Yoon, K. J. & Zimmerman, J., J. 2008, Detection of respiratory pathogens in air samples from acutely infected pigs, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 72:367–370.
83. **Hermann, J. R.,** Hoff, S., Muñoz-Zanzi, C., Yon, K., Roof, M., Burkhardt, A. & Zimmerman, J., 2007, Effect of temperature and relative humidity on the stability of infectious porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols, *Vet. Res.* 38:81–93.
84. **Hermann, J. R.,** Hoff, S. J., Yoon, K. J., Burkhardt, A. C., Evans, R. B. & Zimmerman, J. J., 2006 Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus, *Applied and Environmental Microbiology*, 72:7:4811–4818.
85. **Hiroya, I.,** 2010 Development of a *cps*-based multiplex PCR for typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 5, *Journal of Veterinary Medical Science*, Advance Published Date: 13 Jan 2010.
86. **Hoang N.T. et al.,** 2013. *Streptococcus suis* and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 19:2,331-333.
87. **Horiguchi, Y.** 2012, Swine atrophic rhinitis caused by *Pasteurella multocida* toxin and *Bordetella dermonecrotic* toxin. *Curr Top Microbiol Immunol.* 361:113-129.
88. **Hozbor, D.,** Fouque, F. & Guiso, N., 1999, Detection of *Bordetella bronchiseptica* by polymerase chain reaction, *Res. Microbiology*, 150:333-341.
89. **Hsuan, S. L.,** Liao, C. M., Huang, C., Winton, J. R., Chen, Z. W., Lee, W. C., Liao, J. W., Chen, T. H., Chiou, C. J., Yeh, K. S. & Chien, M. S., 2009, Efficacy of a novel *Pasteurella multocida* vaccine against progressive atrophic rhinitis of swine, *Vaccine*, 27:2923–2929.
90. **Hu, Q.,** Liu, P., Yu, Z., Zhao, G., Li, J., Teng, L., Zhou, M., Bei, W., Chen, H. & Jin, M., 2009, Identification of a cell wall-associated subtilisin-like serine protease involved in the pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2, *Microbial Pathogenesis*, 30:1–7.
91. **Hu, J.** & Zhang, C. 2013. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: current status and strategies to a universal vaccine. *Transbound Emerg Dis.* In press.
92. **Hunt, R.,** 2009, <http://www.pathmicro.med.sc> (Microbiology and Immunology on line, University of South Carolina).

93. **Hwi W, et al.**, 2012 Comparison of cell-mediated immunity induced by three commercial single-dose *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins in pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*. In press.
94. **IBT-UNAM**, 2008, www.ibt.unam.mx (Instituto de biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México).
95. **INEGI**, 2005, www.inegi.org.mx (Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática) Cartas de climas.
96. **INEGI**, 2005, Estadística de sacrificio de ganado en rastros municipales por entidad federativa 2000-2005, Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática, 1-131 pp.
97. **Ingraham, J. L. & Ingraham, C. A.**, 1998, Introducción a la Microbiología, 1ª edición, Editorial REVERTÉ S. A., Barcelona, 448-449 pp.
98. **Invitrogen**, 2007. www.invitrogen.com (TRIzol Reagent, total RNA isolation reagent).
99. **Irie, Y. & Yuk, M. H.**, 2007, *In vivo* colonization profile study of *Bordetella bronchiseptica* in the nasal cavity, *FEMS. Microbiol. Lett.* 275:191-198.
100. **Jiang, H., Fan, H. & Lu, C.**, 2009, Identification and distribution of putative virulent genes in strains of *Streptococcus suis* serotype 2 *Veterinary Microbiology*, 133:309-316.
101. **Jiang, Y., Shang, H., Xu, H., Ding, X., Zhao, L., Fang, L. & Chen, W.**, 2010, Detection and genotyping of porcine Circovirus in naturally infected pigs by oligo-microarray, *Research in Veterinary Science*, In press.
102. **Jindal, N., Chander, Y., de Abin, M., Sreevatsan, S., Stallknecht, D., Halvorson, D. A. & Goyal, S. M.**, 2009, Amplification of four genes of influenza A viruses using a degenerate primer set in a one step RT-PCR method, *Journal of Virological Methods*, 160:163-166.
103. **Jirawattanapong, P., Stockhofe-Zurwieden, N., Van Leengoed, L., Wisselink, H., Raymakers, R., Crujisen, T., Van der Peet-Schwering, C., Nielen, M., & Van Nes, A.**, 2010, Pleuritis in slaughter pigs: Relations between lung lesions and bacteriology in 10 herds with high pleuritis, *Research in Veterinary Science*, 88:11-15.
104. **Jones-Jones, J. K., Ochoa-Ochoa, F. R., Sherwell-Caballero, P., Cruz-Fernández, C., Knutson, R. D., Westhoff, P.C. & Brown, D. S.**, 2009, Escenario Base, 09-18, Proyecciones para el sector Agropecuario en México, SAGARPA, 1-76 pp.
105. **Juhan, N. M., LeRoith, T., Opriessnig, T. & Meng, X. J.**, 2010, the open reading frame 3 (ORF3) of porcine Circovirus type 2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by an ORF3-null PCV2 mutant, *Virus Research*, 147:60-66.
106. **Jung, K., Ha, Y., Kim, S. H. & Chae, C.**, 2004, Developed a polymerase chain reaction comparison with *in situ* Hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in formalin-fixed paraffin embedded tissues, *J. Vet. Med.*, 66:7:841-845.
107. **Jung, K., Renukaradhya, G. J., Alekseev, K. P., Fang, Y., Tang, Y. & Saif, L. J.**, 2009, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modifies innate immunity and alters disease outcome in pigs subsequently infected with porcine respiratory coronavirus: implications for respiratory viral co-infections, *Journal of General Virology*, 90:2713-2723.
108. **Jung, B.G, Lee, J. A, & Lee, B. J.** 2012. Immunoprophylactic effects of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) against *Bordetella bronchiseptica* in mice. *J Microbiol* 50: 6,1003-1008.

109. **Jung, T.**, Choi, C. & Chae, C., 2002, Localization of swine influenza virus in naturally infected pigs, *Vet. Pathol.*, 39:10–16.
110. **Kahlisch, D.**, Buettner, F. F. R., Naim, H. Y., Gerald-Friedrich, G. & the members of the FUGATO-consortium IRAS, 2009, Glycoprotein analysis of porcine bronchoalveolar lavage fluid reveals potential biomarkers corresponding to resistance to *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infection, *Veterinary Reserches*, 40:60:1-19.
111. **Kalorey, D. R.**, Yuvaraja, S., Vanjaria, S. S., Gunjala, P. S., Dhanawadea, N. B., Barbuddheb, S. B. & Bhandarkar, A. G., 2008, PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from an outbreak of pasteurellosis in Indian pigs, *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 31:459–465.
112. **Kamp, E. M.**, Bokken, G. C. A. M., Vermeulen, T. M. M., de Jong, M. F., Buys, H. E. C. M., Reek, F. H. & Smits, M. A., 1996A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8:304-309.
113. **Karasin, A. I.**, Carman, S. and Olsen, C. W., 2006, identification of human h1n2 and human-swine reassortant h1n2 and h1n1 influenza A viruses among pigs in Ontario, Canada (2003 to 2005), *Journal of Clinical Microbiology*, 44:3:1123–1126.
114. **Karuppanan, A. K.**, Liu, S., Jia, O., Selvaraj, M. & Kwang, J., 2010, Porcine circovirus type 2 ORF3 protein competes with P53 in binding to Pirh2 and mediates the deregulation of P53 homeostasis, *Virology*, 398:1–11.
115. **Kim, J.**, Fahad, A., Shanmukhappa, K. & Kapil S., 2006 Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10, *Journal of Virology*, 80:2:689–696.
116. **Kim, L.**, Chang, K. O., Sestak, K., Parwani, A. & Saif, L. J., 2000, Development of a reverse transcription–nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12:385–388.
117. **Kiorpes, A. L.**, MacWilliams, P. S., Shekman, D. I. & Backstrom L. R., 1990. Blood gas and hematological changes in experimental peracute porcine pleuropneumonia, *Can. J. Vet. Res.*, 54:164-169.
118. **Koidl, C.**, Bozic, M., Burmeister, A., Hess, M., Marth, E. & Kesslerjournal, H., H., 2007, Detection and Differentiation of *Bordetella* spp. by Real-Time PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 45:2:347–350.
119. **Kwon, H. M.**, Saif, L. J. & Jackwood, J., 1998, Fiel isolates of trasmissible gastroenteritis virus differ at molecular at the molecular level from the miller and purdue virulent and attenuated strains from porcine respiratory Coronaviruses, *J. Vet. Med. Sci.*, 60:5:589-597.
120. **Labrie, J.**, Pelletier-Jacques, G., Deslandes, V., Ramjeet, M., Auger, E., Nash, J. H. E. & Jacques, M. (2010). Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res* 41, 3-10.
121. **Lalle, E.**, Bordi, L., Castilletti, C., Meschi, S., Selleri, M., Carletti, F., Lapa, D., Travaglini, D., Ippolito, G., Capobianchi, M. R. & Di Caro, A., 2010, Design and clinical application of a molecular method for detection and typing of the influenza A/H1N1pdm virus, *Journal of Virological Methods*, 163:486–488.
122. **Larochelle, R.**, D’Allaire, S. & Magar, R., 2003, Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Québec, *Virus Research*, 96:3-14.
123. **Lawhorn, B.**, 1998, Swine Pneumonia, *Agricultural Communications, Texas A&M University System*, 5203 pp.

124. **Lawhorn**, B., 2000, Porcine reproductive and respiratory syndrome, Texas Agriculture Extension Service, The Texas A & M University System.
125. **Lax**, A., 2012. The *Pasteurella multocida* Toxin: A Newparadigm for the Link Between Bacterial Infection and Cancer, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 361: 131-144.
126. **Lee**, C., Kim, H., Kang, B., Yeom, M., Han, S., Moon, H., Park, S., Kim, H., Song, D. & Park, B., 2010, Prevalence and phylogenetic analysis of the isolated type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2007 to 2008 in Korea, *Virus Genes*, 2-6.
127. **Lee**, C. S., Kang, B. K., Lee, D. H., Lyou, S. H., Park, B. K., Ann, S. K., Jung, K. & Song, D. S., 2008, One-step multiplex RT-PCR for detection and subtyping of swine influenza H1, H3, N1, N2 viruses in clinical samples using a dual priming oligonucleotide (DPO) system, *Journal of Virological Methods*, 151:30-34.
128. **Lee**, G., Chiu, C. Y., Haller, B. L., Denn, P. M., Hall, C. S. & Gerberding, J. L., 2008, *Streptococcus suis* Meningitis, United States *Emerging Infectious Diseases*, 14:1:183-185.
129. **Lee** J, Kang, H.E. & Woo, H.J. 2012. Protective immunity conferred by the C-terminal fragment of recombinant *Pasteurella multocida* toxin. *Clin Vaccine Immunol*.19:9, 1526-1531.
130. **Lehtola**, M. J., Torvinen, E., Miettinen, I. T. & Keevil, C. W., 2006, Fluorescence *In Situ* Hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in potable-water biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 72:1:848-853.
131. **Li**, J. X., Jiang, P., Wang, Y., Li, Y. F., Chen, W., Wang, X. W. & Li, P., 2009, Genotyping of *Haemophilus parasuis* from diseased pigs in China and prevalence of two coexisting virus pathogens, *Preventive Veterinary Medicine*, 91:274-279.
132. **Li**, W., Liu, L., Chen H. & Zhou, R., 2009, Identification of *Streptococcus suis* genes preferentially expressed under iron starvation by selective capture of transcribed sequences, *FEMS Microbiol Lett*, 292:123-133.
133. **Lobo**, E., 2005, *Mycoplasma hyopneumoniae* y su relación con los procesos respiratorios del cerdo (*Mycoplasma hyopneumoniae* and its relation with the respiratory processes in swine), *Revista Electronica de Veterinaria*, 6:10:1-8.
134. **Lodish**, H., 2005, Molecular Cell Biology, 5a edición, Médica Panamericana, 255-258pp.
135. **Lone**, A., Deslandes, V., Nash, J. H. E., Jacques, M. & MacInnes, J. I., 2009, Modulation of Gene Expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Exposed to Bronchoalveolar Fluid, *Plos ONE*, 4:7:139 (1-9).
136. **Lyoo**, K.S., Park, Y. H. & Park, B. K. 2001, Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. *J Vet Sci*, 2:201-207.
137. **Ma**, W., Gramer, M., Rossow, K. & Yoon, K.J., 2006, Isolation and genetic characterization of new reassortant H3N1 swine influenza virus from pigs in the midwestern United States, *Journal of Virology*, 80:10:5092-5096.
138. **MacInnes**, J. I., Gottschalk, M., Lone, A. G., Metcalf, D. S., Ojha, S., Rosendal, T., Watson, S. B. & Friendship, R.M., 2008, Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella*

- multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 72:242–248.
139. **Maes**, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M. & Haesebrouck, F., 2008, Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs, *Veterinary Microbiology*, 126:297–309.
140. **Magar**, R. & Larochelle, R., 2004, Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig meat and experimental transmission following oral exposure, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 68:259–266.
141. **Mahony**, J. B., Hatchette, T., Ojkic, D., Drews, S. J., Gubbay, J., Low, D. E., Petric, M., Tang, P., Chong, S., Luinstra, K., Petrich, A. & Smieja, M., 2009, Multiplex PCR tests sentinel the appearance of pandemic influenza viruses including H1N1 swine influenza, *Journal of Clinical Virology*, 45:200–202.
142. **Mardassi**, H., Mounir, S. & Dea, S., 1995, Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain, *Arch. Virol.*, 140:1405-1418.
143. **Marchioro** S.B., et al., 2013. Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Vaccine*, 12; 1855-5.
144. **Marois**, C., Bougeard, S., Gottschalk, M. & Kobisch, M., 2004, Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus suis* species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of live and dead pigs, *Journal of Clinical Microbiology*, 42:7:3169–3175.
145. **Marois**, C., Dory, D., Fablet, C., Madec, F. & Kobisch, M., 2009, Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs, *Journal of Applied Microbiology*, 1-11.
146. **Marois**, C., Le Devendec, L., Gottschalk, M. & Kobisch, M., 2007, Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 71:14–22
147. **Mayor**, D., Zeeh, F., Frey, J. & Kuhnert, P., 2007, Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material *Veterinary Research*. 38:391–398.
148. **Medina-Figueroa** A., Loera-Muro, V. M., Ramírez-López, E. M., Avelar-González, F. J. & Guerrero-Barrera, A. L., 2010, Identificación de patógenos respiratorios del cerdo en el ambiente que los rodea, en granjas porcícolas del estado de Aguascalientes, VII Encuentro participación de la mujer en la ciencia.
149. **Méndez- Medina**, R., Becerril- Herrera, M., Rubio- Lozano, M. & Delgado- Suárez, E., 2003, Características de la canal de cerdo Pelón Mexicano, procedente de Mizantla, Veracruz, México, *Vet. Mex.*, 33:1:27-38.
150. **Mifflin**, J. K. & Blackall, P.J., 2001, Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*, *Letters in Applied Microbiology*, 33:216-221.
151. **Molina-Gonzalez**, G., Roasles, M. E., Bárcenas-Morales, G. & Montaraz-Crespo, J. A., 2006, Isolation and characterization of *Bordetella bronchiseptica* strains from canine origin, *Vet. Mex*, 37:3:313-325.
152. **Mondaca-Fernández**, E., Murtaugh, M. P. & Morrison R. B., 2006 Association between genetic sequence homology of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and geographic distance between pig sites, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 70:237–239

153. **Moorkamp**, L., Hewicker-Trautwein, M. & Grosse-Beilage, E., 2009 Occurrence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in coughing piglets (3–6 weeks of age) from 50 herds with a history of endemic respiratory disease. *Transboundary and Emerging Diseases*. 56:54–56.
154. **Morfín Mata**, M. Co-tutora de la estudiante de maestría del programa de Maestría en Ciencias y Tecnologías Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos. Detección molecular de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdos de granjas porcinas del estado de Aguascalientes. Culminada 29 de julio de 2009.
155. **Morgan**. S.B, *et al.*, 2012. Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance. *Vet Microbiol*. In press.
156. **Morilla**, A., Yoon, K. & Zimmermen, J., 2004, Enfermedades víricas emergentes del cerdo, 1^{er} edición, editorial Multimedica ediciones veterinarias, España, 442 pp.
157. **Mullins**, M.A. Register, K.B. Brunelle, B.W. Aragon, V. Galofré-Mila, N. Bayles, D.O. & Jolley, K.A. 2013 A curated public database for multilocus sequence typing (MLST) and analysis of *Haemophilus parasuis* based on an optimized typing scheme. *Vet Microbiol*. 23; 16, 899-906.
158. **Mullins**, M. A., Register, C. B., Bayles, D. O., Loving, C. L., Nicholson, T. L., Brockmeier, S. L., Dyer, D.W. & Phillips, G. J., 2009, Characterization and Comparative Analysis of the Genes Encoding *Haemophilus parasuis* Outer Membrane Proteins P2 and P5, *Journal of Bacteriology*, 191:19:5988–6002.
159. **Nathues** H, *et al.* 2012. Herd-Level Risk Factors for the Seropositivity to *Mycoplasma hyopneumoniae* and the Occurrence of Enzootic Pneumonia Among Fattening Pigs in Areas of Endemic Infection and High Pig Density. *Transbound Emerg Dis*. In press.
160. **Negrete-Abascal**, E. ,Reyes, M., García, R., Vaca, S., Girón, J., García, O., Zenteno, E. y de la Garza, M. 2003. Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae* *J. Bacteriol*. 185:2, 664- 668.
161. **Nicholson**, T. L., Brockmeier, S. L. & Loving, C. L., 2009, Contribution of *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinin and pertactin to respiratory disease in swine, *Infection and Immunity*, 77:5:2136–2146.
162. **Nicholson**, T. L. *et al.*, 2012. Phenotypic Modulation of the Virulent Bvg Phase Is Not Required for Pathogenesis and Transmission of *Bordetella bronchiseptica* in Swine, *Infection and Immunity*. 1025–1036.
163. **Nicholson**, T.L., Kukielka, D., Vincent, A.L., Brockmeier, S.L., Miller, L.C. & Faaberg, K.S. 2011. Utility of a panviral microarray for detection of swine respiratory viruses in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 4:1542-1550.
164. **O'Connor**, L., 2006, Diagnostic Bacteriology Protocols, Methods in Molecular Biology, Segunda edición, HUMABA PRESS, U. S. A., 69-75pp.
165. **Ogawa**, H., Taira, O., Hirai, T., Takeuchi, H., Nagao, A., Ishikawa, Y., Tuchiya, K., Nunoya, T. & Ueda, S., 2009, Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections, *Journal of Virological Methods*, 160:210–214.
166. **Oliveira**, S., Galina, L. & Pijoan, C., 2001, Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13:495–501.
167. **Opriessnig**, T., Gimenez-Lirola, L. G. and Halbur, P. G. 2011. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Animal Health Research Reviews*, 12:2, 133-148.

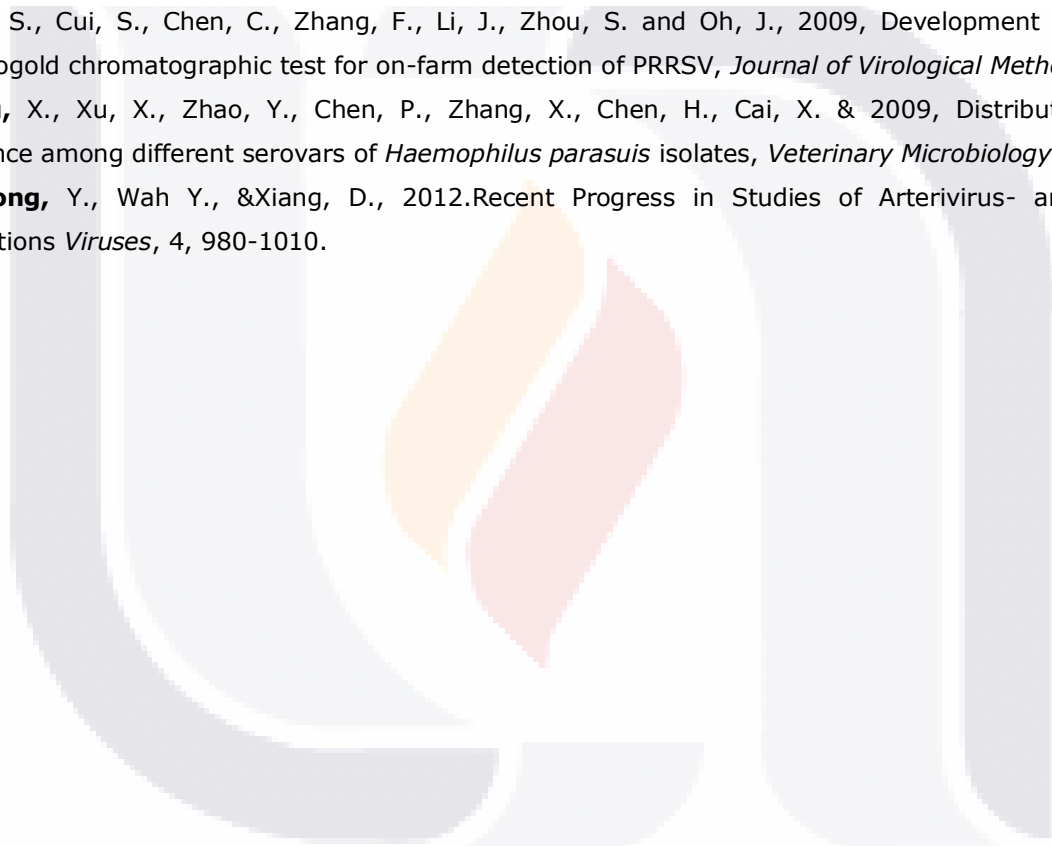
168. **Orr**, D. E. & Shen, Y., 2006, World pig production, opportunity or threat, Midwest swine nutrition conference, 1-6
169. **Palzer**, A., Ritzmann, M., Wolf, G. & Heinritzi, K., 2008, Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia, *The Veterinary Record*, 1-5.
170. **Park**, C., Oh, Y., Seo, H.W., Han, K. & Chae, C. 2013. Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model. *Clin Vaccine Immunol*. In press.
171. **Pejsak**, Z., Podgórska, K., Truszczynski, M., Karbowski, P. & Stadejek, T., 2009, Efficacy of different protocols of vaccination against porcine Circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, In press.
172. **Pérez**, L. J., Díaz de Arce, H., Percedo, M. I., Domínguez, P. & Frías, M. T., 2009, First report of porcine Circovirus type 2 infections in Cuba, *Research in Veterinary Science*, In press.
173. **Pérez** L.J *et al.*, 2013. Isolation and complete genomic characterization of pandemic H1N1/2009 influenza viruses from Cuban swine herds. *Res Vet Sci*. in press.
174. **Pinto**, P. M., Klein, C. S., Zaha, A & Ferreira, H. B., 2009, Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Proteome Science*, 7:45:1-11.
175. **Pósa**, R., *et al.*, 2011 Interaction of *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, and fumonisin B1 in the porcine respiratory tract as studied by computed tomography. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 75:176-182.
176. **Pirzadeh**, B. & Dea, S., 1998, Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Journal of General Virology*, 79:989-999.
177. **Prieto- Macías**, C. K. Tutora de la estudiante de la Maestría Interinstitucional en Ciencias Morfológicas Proyecto: Detección y caracterización de estructuras tipo granuloma en la pleuroneumonía porcina crónica. Culminada 15 de abril de 2007.
178. **Princivalli**, M. S., Palmieri, C., Magi, G., Vignaroli, C., Manzin, A., Camporese, A., Barocci, S., Magistrali, C. & Facinelli, B., 2009, Genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs and humans in Italy (2003-2007), *Euro Surveillance*, 14:33:1-7.
179. **Redondo**, E., Masot, A. J., Fernández, A. & Gázquez, A., 2009, Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *J. Comp. Path.*, 140:260-270.
180. **Register**, K. B. & DeJong, K. D., 2006, Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine, *Veterinary Microbiology*, 117:201-210.
181. **Reguera**, J. Santiago, C. Mudgal, G. Ordoño, D. Enjuanes, L. & Casasnovas, J.M. 2012. Structural bases of coronavirus attachment to host aminopeptidase N and its inhibition by neutralizing antibodies. *PLoS Pathog*. In press.

182. **Reiner, G.**, Fresen, C., Bronnert, S., Haack, I. & Willems, H. 2010. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. *J Wild Dis* 46, 551-555.
183. **Ren, W.**, Li, Y., Yu, X., Luo, W., Liu, G., Shao, H. & Yin, Y. 2013. Glutamine modifies immune responses of mice infected with porcine circovirus type 2. *Br J Nutr.* 28:1-8.
184. **Rivera-Tapia, J. A.**, Cedillo- Ramírez, M. A. & Vega-Benítez, M., 2001, Micoplasmas y su importancia médica, *Rev.Biomed.*, 12:262-271.
185. **Rodríguez, J.**, 2011. Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* mediante tecnicas de biología molecular.
186. **Rodríguez-Cariño, S.**, Sánchez-Chardi A. & Segalés, J., 2010, Subcellular immunolocalization of porcine Circovirus type 2 (PCV2) in lymph nodes from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Journal of Comparative Pathology*, In press.
187. **Rodríguez -Ferri, E F.**, Martínez, S., Frandoloso, R., Yubero, S. & Gutiérrez- Martín, C. B., 2009, Comparative efficacy of several disinfectants in suspension and carrier tests against *Haemophilus parasuis* serovars 1 and 5, *Research in Veterinary Science*, in Press.
188. **Ross, R. F.**, 2007, *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia, *Animal Health Research Reviews*, 7:1/2:13-29.
189. **Rumschlag-Booms, E.** & Rong. L. 2013. *Review Article: Influenza Virus Entry Implications in Virulence and Future Therapeutics. Advances in Virology*, in press.
190. **SAGARPA**, 2009, Sistema de Producción porcina, Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación, subsecretaria de desarrollo rural, dirección general de apoyos para el desarrollo rural, 1-8.
191. **Schuchert, J. A.**, Inzana, T. J., Angen, Ø., & Jessing, S., 2004, Detection and Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 1, 2, and 8 by Multiplex PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 9: 4344-4348.
192. **Sellyei, B.**, Varga, Z., Ivanics, E. & Magyar, T., 2008, Characterisation and comparison of avian *Pasteurella multocida* strains by conventional and eric-pcr assays, *Acta Veterinaria Hungarica*, 56:4:429-440.
193. **SEM**, 2009, <http://www.semicro.es> (Sociedad española de Microbiología).
194. **Sibila, M.**, Calsamiglia, M., Vidal, D., Badiella, L., Aldaz, A. & Jensen, J. C., 2004, Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production Systems, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 2004;68:12-18.
195. **Sibila, M.**, Mentaberre, G., Boadella, M., Huerta, E., Casas-Díaz, E., Vicente, J., Gortázar, C., Marco, I., Lavín, S. & Segalé, J., 2009, Serological, pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in the wild boar, *Veterinary Microbiology*, in press.
196. **Silva-Briano M.**, Martínez-Hernández, S. L., Adabache-Ortíz, A., Ventura-Juárez, J., Salinas, E. & Quintanar, J. L., 2007, Ultrastructural analysis and identification of membrane proteins in the free-living amoeba *Diffugia corona*, *Biocell*, 31:225- 232.
197. **Stakenborg, T.**, Vicca, J., Butaye, P., Imberechts, H., Peeters, J., de Kruijt, A., Haesebrouk, F. & Maes, D., 2006, A multiplex PCR to identify porcine mycoplasma present in broth cultures, *Veterinary Research Communications*, 30:239-247.

198. **Takada-Iwao**, A., Uto, T., Mukai, T., Okada, M., Futo, S. & Shibata, I., 2007, Evaluation of indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using recombinant toxin for detection of antibodies against *Pasteurella multocida* toxin, *Journal Veterinary Medical Science*, 69:6:581-586.
199. **Tang**, X., Zhao, Z., Hu, J., Wu, B., Cai, X., He, Q. & Chen, H., 2009, Isolation, Antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China, *Journal of Clinical Microbiology*, 47:4:951-958.
200. **Tang**, F., Zhang, W. & Lu, C. 2013. Lysogenic *Streptococcus suis* Isolate SS2-4 Containing Prophage SMP Showed Increased Mortality in Zebra Fish Compared to the Wild-Type Isolate. *PLoS One*. 8:1.
201. **Thomson** Reuters, influenza A (H1N1), Disease briefing from THOMSON REUTERS Integrity. This file was created on: 5 March 2010, Prous Science Integrity Copyright 2010 - Prous Science. All rights reserved
202. **Thompson**, J., 2010, <http://www.3tres3.com> (The Scottish Agricultural Collage, Reino Unido).
203. **Townsend**, K.M., Boyce, J. D., Chung, J. Y. Frost, A. J. & Adler, B., 2001, Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap* loci and development of a multiplex capsular PCR typing system, *Journal of Clinical Microbiology*, 39:3:924-929.
204. **Varga**, Z., Sellyei, B. & Magyar, T., 2007, Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* strains isolated from pigs in hungary, *Acta Veterinaria Hungarica*: 55:4:425-434.
205. **Usami**, Y., Fukai, K., Ichikawa, Y., Ookuda, Y., Shibata, Y., Motoyama, C., Imai, K., & Kirisawa, R., 2008, Virological and serological studies of porcine respiratory coronavirus infection on a Japanese farm, *J. Vet. Med. Sci.*, 70:9:929-936.
206. **Van Gucht**, S., Atanasova, K., Barbe, F., Cox, E., Pensaert, M. & Van Reeth, K., 2006, Effect of porcine respiratory coronavirus infection on lipopolysaccharide recognition proteins and haptoglobin levels in the lungs, *Microbes and Infection*, 8:1492-1501.
207. **Vera-Lizarazo**, Y. A., Rodríguez-Ferri, E. F. & Gutiérrez-Martín, C. B., 2008, Evaluation of different API systems for identification of porcine *Pasteurella multocida* isolates, *Research in Veterinary Science*, 85:453-456.
208. **Vilcek**, S., Vlasakova, M. & Jackova, A., 2010, LUX real-time PCR assay for the detection of porcine circovirus type 2, *Journal of Virological Methods*, In press.
209. **Wang**, X. & Christopher-Hennings, J. 2013. Post-Transcriptional Control of Type I Interferon Induction by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Its Natural Host Cells. *Viruses*, 4: 725-733.
210. **Wellenberg**, G. J., Bouwkamp, F. T., Wolf, P. J., Swart, W. A. J. M., Mombarg, M. J. & de Gee A.L. W., 2010, A study on the severity and relevance of porcine Circovirus type 2 infections in Dutch fattening pigs with respiratory diseases, *Veterinary Microbiology*, In press.
211. **Wertheim**, H. F. L., Nguyen, H. N., Taylor, W., Lien, T. T. M., Ngo, H. T., Nguyen, T. Q., Nguyen, B. N. T., Nguyen, H. H., Nguyen, H. M., Nguyen, C. P., Dao, T. T., Nguyen, T. V., Fox, A., Farrar, J., Schultsz, C., Nguyen, H. D., Nguyen, K. H. V. & Horby, P., 2009, *Streptococcus suis*, an important cause of adult bacterial meningitis in northern Vietnam, *PLoS ONE*, 4:6: e5973.

212. **Wesley**, R., 2002, Neutralizing antibody decay and lack of contact transmission after inoculation of 3- and 4-day-old piglets with porcine respiratory coronavirus, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 14:525–527.
213. **Wesley**, R. & Lager, K. M., 2003, Increased litter survival rates, reduced clinical illness and better lactogenic immunity against TGEV in gilts that were primed as neonates with porcine respiratory coronavirus (PRCV), *Veterinary Microbiology*, 95:175–186.
214. **Wilkie**, I. W., Harper, M., Boyce, J. D. & Adler, B. 2012 *Pasteurella multocida*: Diseases and Pathogenesis, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 361: 1–22.
215. **Williams**, J., Torres, M. & Sansor, R., 2000, Prevalencia, caracterización y extensión de las lesiones en pulmones de cerdos sacrificados en el rastro municipal de Mérida, Yucatán. *Revista Biomédica*, 11:25-32.
216. **Winstanley**, C., Hales, B. A., Sibanda, L. M., Dawson, S., Gaskell, R.M. & Hart, C. A., 2000, Detection of type III secretion system genes in animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*, *Veterinary Microbiology*, 72:329-337.
217. **Wisselink**, H. J., Joosten, J. J. & Smith, H. E., 2002, Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs, *Journal of Clinical Microbiology*, 40:8:2922–2929.
218. **Wu**, T., Chang, H., Tan, C., Bei, W., & Chen, H., 2009, The orphan response regulator RevSC21 controls the attachment of *Streptococcus suis* serotype-2 to human laryngeal epithelial cells and the expression of virulence genes, *FEMS Microbiol Lett*, 292:170–181.
219. **Yamaguti**, M., Muller, E. E., Piffer, A. I., Kich, J. D., Klein, C. S. & Kuchiishi, S. S., 2008, Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by polymerase chain reaction in swine presenting respiratory problems, *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:471-476.
220. **Yoneyama**, S., Hayashi, T., Kojima, H., Usami, Y., Kubo, M., Takemae, N., Uchida Y. & Saito, T., 2009, Occurrence of a pig respiratory disease associated with swine influenza A (H1N2) virus in Tochigi Prefecture, Japan, *The Journal of Veterinary Medical Science*, In press.
221. **Yoon**, K. J., Janke, B. H., Swalla, R. W. & Erickson, G., 2004, Comparison of a commercial H1N1 enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination inhibition test in detecting serum antibody against swine influenza viruses, *J. Vet. Diagn. Invest.* 16:197–201.
222. **Yu**, H., Jing, H., Chen, Z., Zheng, H., Zhu, X., Wang, H., Wang, S., Liu, L., Zu, R., Luo, L., Xiang, N., Liu, H., Liu, X., Shu, Y., Lee, S. S., Chuang, S. K., Wang, Y., Xu, J., Yang, W. & the *Streptococcus suis* study groups, 2006, Human *Streptococcus suis* Outbreak, Sichuan, China, *Emerging Infectious Diseases*, 12:6:914-920.
223. **Yue**, F., Cui, S., Zhang, C. & Yoon, K. J., 2009, A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens, *Virus Genes*, 38:392–397.
224. **Zenteno**. 2003. Pasado, presente y futuro de las técnicas diagnósticas de tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 16: 181-186

225. **Zhang**, Q, Hu, R, Hu, J, He, H, Tang, X, Jin, M, Chen, H. & Wu B. 2013, aroA deleted *Bordetella bronchiseptica* inspiring robust mucosal immune response and provide full protection against intranasal challenge. *Res Vet Sci.* 94,55-61.
226. **Zhang**, J.M. *et al.*, 2012 Detection of *Haemophilus parasuis* isolates from South China by loop-mediated isothermal amplification and isolate characterisation. *Onderstepoort J Vet Res.* 24; 79,1-6.
227. **Zhao**, M. Liu, X.D. Li, X.Y. Chen, H.B. Jin, H. Zhou, R. Zhu, M.J. & Zhao, S.H. 2013. Systems infection biology: a compartmentalized immune network of pig spleen challenged with *Haemophilus parasuis*. *BMC Genomics.* 22; 14, 1-46.
228. **Zhou**, S., Cui, S., Chen, C., Zhang, F., Li, J., Zhou, S. and Oh, J., 2009, Development and validation of an immunogold chromatographic test for on-farm detection of PRRSV, *Journal of Virological Methods*, 160:178–184.
229. **Zhou**, X., Xu, X., Zhao, Y., Chen, P., Zhang, X., Chen, H., Cai, X. & 2009, Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates, *Veterinary Microbiology*, 141:168–173.
230. **Zhong**, Y., Wah Y., & Xiang, D., 2012. Recent Progress in Studies of Arterivirus- and Coronavirus-Host Interactions *Viruses*, 4, 980-1010.





II- ANEXOS

11.1 Procedimiento para la toma y envío de muestras de las granjas porcícolas

1. Se programó la cita para día y hora de muestreo, con el veterinario o encargado de la granja porcícola.
2. No se visitó más de una granja por día
3. Se llevó el material completo para visita, el cual consistió en:
 - a) Overol o bata limpios
 - b) Botas limpias
 - c) Guantes
 - d) Desinfectante
 - e) Hielera
 - f) Refrigerante
 - g) Pala chica o cuchara grande
 - h) Marcadores o plumones para marcar las muestras
 - i) Cinta adhesiva
 - j) Alcohol
 - k) Encendedor
 - l) Parafilm o vitafilm
 - m) Libreta de campo
 - n) Hoja impresa de distribución de la granja para su posterior llenado.
 - o) Medios de cultivo para toma de aire
 - p) Tubos vacíos estériles para hisopos
 - q) Tubos vacíos estériles para agua
 - r) Tubos vacíos estériles para orina
 - s) Hisopos estériles para exudado nasal
 - t) Bolsas para alimento estériles de las diferentes etapas que se tengan (Inicial, Crecimiento, Finalizador, etc.)
 - u) Bolsas estériles para el muestreo de suelo
5. Se siguieron las instrucciones de los encargados de las granjas (orden, desinfección, uso de overol y botas, etc.)
6. En la toma de muestras en la granja:
 - a) Se marcó con el nombre de la granja, tipo de muestra, fecha, número de nave, número de corral del que se tomó la muestra y dar una numeración progresiva a cada cerdo muestreado.
 - b) Se llenó la hoja de distribución de la granja
 - c) *Muestras de agua*: primero se esterilizó con fuego la llave de agua o bebedero por un minuto y posteriormente se tomó la muestra.
 - d) *Muestras de ambiente o de aire*: Las cajas Petri con el medio de cultivo (agar sangre) se colocaron abiertas por un lapso de 5 min, en un lugar representativo, después se cerraron y sellaron con parafim o vitafilm.
 - e) *Muestras de alimento*: se tomó del alimento que los cerdos estaban consumiendo en ese momento de la parte superior del comedero donde el cerdo no tuvo contacto con el (muestreo con pala o cuchara)

- f) *Muestras de orina*: se tomó en el momento que el cerdo estuvo orinando.
- g) *Muestras de exudado nasal*: Se introdujo el hisopo en la cavidad nasal suavemente, girándolo para que entrará con facilidad a cavidad. Se retiró suavemente de la misma manera. Se depositó la muestra en un tubo estéril.
- h) *Muestra de suelo*: Se tomó directamente del suelo del corral.
- i) Todas las muestras fueron depositadas en tubos estériles (Corning 50ml y Axygen scientific 15 ml) y almacenadas a 4°C hasta su procesamiento.

7. Después del muestreo:

- a) Se limpio todo el material que se ensució en el muestreo a la llegada al laboratorio.
- b) Se Guardó las muestras en los lugares correspondientes de cada muestra según de la indicación el encargado del laboratorio.

Notas importantes:

- La toma de muestras será de manera proporcional, procurando tomar muestras de cerdos de diferentes pesos y edades.
- La toma de las demás muestras, se realizó según como se describió en la metodología
- Se anotó en la libreta de campo todo lo que se hizo en el muestreo.
- Rotulo todo lo que se muestreo (nombre de la granja, tipo de muestra, fecha, número de nave, número de corral del que se tomó la muestra, se numeró progresivamente a cada animal muestreado) y se anotó en la libreta de campo, de tal manera que fue fácil el ubicar el lugar muestreado. Se dividió por grupos las actividades del muestreo para facilitar y agilizar el muestreo.

Artículo

Publicado

*“Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms”*

Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms

Victor M. Loera-Muro,¹ Mario Jacques,² Yannick D. N. Tremblay,² Francisco J. Avelar-González,¹ Abraham Loera Muro,¹ Elsa M. Ramírez-López,¹ Alejandra Medina-Figueroa,¹ Higinio M. González-Reynaga¹ and Alma L. Guerrero-Barrera³

Correspondence

Alma L. Guerrero-Barrera
alguerre@correo.uaa.mx

¹Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., C. P. 20131, Mexico

²Groupe de recherche sur la maladies infectieuses du porc, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC J2S 7C6, Canada

³Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., C. P. 20131, Mexico

Actinobacillus pleuropneumoniae is the aetiological agent of porcine pleuropneumonia and is normally transmitted by aerosols and direct contact between animals. *A. pleuropneumoniae* has traditionally been considered an obligate pathogen of pigs and its presence in the environment has yet to be investigated. Here, the presence of *A. pleuropneumoniae* was detected in drinking water of pig farms in Mexico using a PCR specific for the RTX toxin gene, *apxIV*. The presence of *A. pleuropneumoniae* in farm drinking water was confirmed by indirect immunofluorescence using an *A. pleuropneumoniae*-specific polyclonal antibody and by fluorescent *in situ* hybridization. Viable bacteria from the farm drinking water were detected using the Live/Dead BacLight stain. Additionally, viable *A. pleuropneumoniae* was selected and isolated using the cAMP test and the identity of the isolated bacteria were confirmed by Gram staining, a specific polyclonal antibody and an *A. pleuropneumoniae*-specific PCR. Furthermore, biofilms were observed by scanning electron microscopy in *A. pleuropneumoniae*-positive samples. In conclusion, our data suggest that viable *A. pleuropneumoniae* is present in the drinking water of swine farms and may use biofilm as a strategy to survive in the environment.

Received 30 January 2012
Revised 10 June 2012
Accepted 20 January 2013

INTRODUCTION

Actinobacillus pleuropneumoniae is a member of the family *Pasteurellaceae* and is responsible for porcine pleuropneumonia (Dousse *et al.*, 2008; Reiner *et al.*, 2010). *A. pleuropneumoniae* can be divided in two biotypes based on their NAD requirement. Serotypes 1, 5 and 7 are the predominant serotypes found in North America while serotype 2 is the predominant serotype in many European countries (Chiers *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). The clinical signs of the disease can be hyperacute, acute or chronic (Xu *et al.*, 2008; Ohba *et al.*, 2010). Chronic porcine pleuropneumonia is usually very contagious because the bacteria persist in the lungs, the tonsils and, in rare cases, the nasal cavity. The persistence of *A. pleuropneumoniae* within chronically infected pigs helps the dispersion of the disease within a herd (Jacobsen *et al.*, 2005; Wagner & Mulks, 2007). The pathogenesis of *A. pleuropneumoniae*

involves several virulence factors, including RTX exotoxins (Apx toxins), lipopolysaccharides, capsular polysaccharides, adhesins, proteases and outer-membrane proteins (Archambault *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2010). Among the virulence factors, the Apx toxins are the factors responsible for the lesions observed in the lungs (Rayamajhi *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2010; Reiner *et al.*, 2010). It has been reported that aerosols are responsible for the dispersion of *A. pleuropneumoniae* over short distances especially when animals are in close proximity. The presence of this pathogen in the environment surrounding pig farms has yet to be reported (Brockmeier *et al.*, 2003; Gião *et al.*, 2010; Reiner *et al.*, 2010). Assavacheep & Rycroft (2013) proposed that *A. pleuropneumoniae* may be transferred between farms if carried on inanimate surfaces in a wet or dried state. They observed that *A. pleuropneumoniae* survived in an aqueous suspension in the presence of NaCl and mucin. Additionally, survival of *A. pleuropneumoniae* was prolonged at lower temperature. In a dry state, *A. pleuropneumoniae* survival improved on hydrophobic

Abbreviations: FISH, fluorescent *in situ* hybridization; SEM, scanning electron microscopy; WGA, wheatgerm agglutinin.

surfaces and in a desiccated environment or under saturated humidity.

Our group found that the prevalence of *A. pleuropneumoniae* in the pig population of the State of Aguascalientes (Mexico) was around 40%, and that disease was commonly in the asymptomatic form. In this work, the presence of *A. pleuropneumoniae* in drinking water obtained from randomly selected pig farms of Aguascalientes was detected by nested PCR, an *A. pleuropneumoniae*-specific polyclonal antibody and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Furthermore, viable and cultivable *A. pleuropneumoniae* was found in drinking water samples. The prevalence of *A. pleuropneumoniae* in the drinking water samples from pig farms was 20%. Biofilms were observed by scanning electron microscopy (SEM) in the *A. pleuropneumoniae*-positive samples. These results suggest that *A. pleuropneumoniae* could be using biofilms as a strategy to survive in the environment.

METHODS

Drinking water samples. Drinking water samples were collected from 12 different swine farms located in the State of Aguascalientes in Mexico (Table 1). No clinical signs of porcine pleuropneumonia were observed in the animals; however, a previous study showed that 40% of the pig herds of Aguascalientes State were positive for *A. pleuropneumoniae* (data not shown). Farms for sample collection were selected randomly. A compound sampling scheme was used (Cochran, 1977). Briefly, every sample was composed of four different taps (10 ml per tap) (Fig. 1). This sampling strategy increased the probability of detecting *A. pleuropneumoniae* and maintained a manageable number of samples. In total, 120 composite samples were obtained and this represented 480 taps. The number of samples obtained per farm was 5–10 or 11–20 for farms with 100–1000 or 1000–3000 animals, respectively. Sampling was done from December 2009 to January 2010. All samples collected on a farm were taken on the same day. The drinking water used by Aguascalientes farms comes from natural pools and treatment such as chlorination is not performed. On the farms, every tap was in contact with animals. Therefore, the faucet was sterilized with a flame for 1 min and water was run for 1 min to reduce the presence of contamination originating from nasal secretion or saliva. Once the operation was completed, the water samples were collected and transferred to sterile tubes, and kept at 4 °C for transportation to the laboratory (Fig. 1).

General methodology. The 120 composite water samples were centrifuged at 10 000 r.p.m. for 10 min to concentrate the bacterial population. The pellets were used to extract DNA and the DNA was used as the template in Apx IV PCR ($n=120$). The pellets from *A. pleuropneumoniae*-PCR-positive samples ($n=24$) were kept and used in subsequent analyses, which included an immunofluorescence assay, a FISH assay, SEM and viability and cultivability tests. The methodology is summarized as a flow chart in Fig. 1.

Growth of bacteria on BHI agar. Water samples were centrifuged at 10 000 r.p.m. for 10 min to concentrate the bacterial population. Then, 80% of the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in the remaining volume. A volume (10 μ l) from each sample was plated on BHI agar (Bioxon) supplemented with NAD (15 μ g ml⁻¹). The plates were incubated overnight at 37 °C with 5% CO₂ (Lehtola *et al.*, 2006). To detect the presence of *A. pleuropneumoniae* using an *A. pleuropneumoniae*-specific nested

PCR, bacteria obtained from an overnight culture were diluted in 2 ml of lysis buffer and DNA was isolated as described below.

Isolation of *A. pleuropneumoniae* from water samples. A cAMP test was used to isolate *A. pleuropneumoniae* from the water samples. Briefly, bacteria obtained from BHI-NAD agar were streaked on blood agar with *Staphylococcus aureus*. Gram staining was performed on colonies obtained from the cAMP test and those suspected to represent *A. pleuropneumoniae* were grown in BHI-NAD broth. These cultures were used to isolate DNA and this DNA was used as the template in a nested PCR test. Furthermore, the cultured bacteria were confirmed to represent *A. pleuropneumoniae* by immunofluorescence with polyclonal antibodies and by FISH.

DNA isolation. DNA was isolated from water samples and bacteria were cultured on plates. Bacterial cultures were prepared as mentioned above. For water samples, 3 ml of the sample was centrifuged at 10 000 r.p.m. for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was kept for DNA isolation. DNA isolation was performed as described by Sambrook & Russell (2001).

Detection of *A. pleuropneumoniae* by PCR. To detect the presence of *A. pleuropneumoniae* in the drinking water samples, specific primers for the *apxIV* gene were used (Frey, 2003). The final volume of the PCR was 25 μ l. The primers used were APXIVA-Forward (5' TGGCACTGACGGTGATGAT 3'), APXIVA-Reverse (3' GGCCATCGACTCAACCAT 5'), APXIVAN-Forward (5' GGGGACGTAACCTCGGTGATT 3') and APXIVAN-Reverse (3' GCTCACCAACGTTTGCTCAT 5'). Conditions for the nested PCR were those described by Frey (2003). The detection limit was 400 pg. For all the reactions, 0.1 μ M of DNA isolated from *A. pleuropneumoniae* strain S4074 was used as a positive control and a reaction without DNA was used as a negative control. In addition, DNA (0.1 μ M) from *Mannheimia haemolytica* was used as a specificity control (Gioia *et al.*, 2006; Dousse *et al.*, 2008). To ensure that the drinking water composition did not interfere with the PCR, spike controls were also used for the drinking water samples that were *A. pleuropneumoniae* negative (Dousse *et al.*, 2008). For the spike controls, 0.1 μ M of *A. pleuropneumoniae* strain S4074 DNA was added to the negative samples. The PCR products were analysed by electrophoresis using 1.5% (w/v) agarose and stained with ethidium bromide (1 μ g ml⁻¹). Images of the gels were captured using the Chemi Doc (Bio-Rad) image analyser and the software Quantity One (Bio-Rad).

Viability test. To determine the presence of viable bacteria in the drinking water samples, bacteria were stained with the Live/Dead BacLight Viability kit (Molecular Probes) as described by Boulos *et al.* (1999). To concentrate the bacterial population, 3 ml of water sample was centrifuged at 10 000 r.p.m. for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was kept for the viability assay. The presence of fluorescent bacteria was recorded using a confocal microscope (CTR4000; Leica Microsystems) and images were captured using the LAS AF image analyser software (Leica).

***A. pleuropneumoniae*-specific polyclonal antibody preparation.** A total protein extract from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain S4074 was prepared as described by Guerrero-Barrera *et al.* (1999). *A. pleuropneumoniae* rabbit polyclonal antibody was generated using the method of Gutiérrez-Cantú *et al.* (2011). Polyclonal antibodies were titrated by Western immunoblot against a total protein extract of *A. pleuropneumoniae*. Dilutions used were 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 and 1:5000.

Detection of *A. pleuropneumoniae* by indirect immunofluorescence in drinking water and cultured samples. To confirm the presence of *A. pleuropneumoniae* in farm drinking water, the *A.*

Table 1. Presence of *A. pleuropneumoniae* in drinking water samples of farms, detected by nested PCR.

Swine farm number and location	Positives in nested PCR	Confirmed by immunofluorescence	Confirmed by FISH	Viable and culturable <i>A. pleuropneumoniae</i> *
1. Pabellón	4/8	4/4	4/4	4/4
2. San Francisco	4/10	4/4	4/4	4/4
3. Jesús María	0/16	—	—	—
4. El Llano	0/10	—	—	—
5. Aguascalientes	3/10	3/3	3/3	3/3
6. Jesús María	0/5	—	—	—
7. Aguascalientes	2/6	2/2	2/2	2/2
8. Asientos	8/20	8/8	8/8	8/8
9. Aguascalientes	0/11	—	—	—
10. Jesús María	3/10	3/3	3/3	3/3
11. Aguascalientes	0/7	—	—	—
12. Aguascalientes	0/7	—	—	—
Total	24/120	24/24	24/24	24/24

*Tested by nested PCR, immunofluorescence and FISH.

3 *pleuropneumoniae*-PCR-positive samples were used in an indirect immunofluorescence assay. Briefly, bacteria from farm drinking water samples (1 ml) and from exponential-phase (OD₆₀₀ of ~0.6) cultures grown in BHI-NAD broth (1 ml) were harvested by centrifugation at 5000 r.p.m. for 10 min. Cells were permeabilized with 2 volumes of methanol for 30 min, then fixed for 20 min with 3.7 (v/v) formaldehyde/PBS (pH 7.4) and then washed with PBS (pH 7.4). Cells were incubated with the *A. pleuropneumoniae*-specific polyclonal antibody (1:25 dilution) for 2 h at 37 °C with gentle agitation. After the incubation, the cells were washed three times with PBS and were incubated with an anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 594 (1:100 dilution) (Molecular Probes) for 1 h at 37 °C with gentle agitation. Cells were washed three times with PBS, and 3 µl of labelled cells was mounted on a Teflon printed slide with 6 mm diameter wells and covered with a No. 1 coverslip (Electron Microscopy Sciences). The stained cells were visualized using a confocal microscope (DMI 4000 B; Leica) and images were analysed using the LAS AF image analyser software. *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain S4074 was used as a positive control and *Escherichia coli* O157:H7 was the negative control (data not shown).

4 **FISH and wheatgerm agglutinin (WGA) labelling.** FISH was performed on the PCR-*A. pleuropneumoniae*-positive samples to confirm the presence of *A. pleuropneumoniae*. Biofilms of *A. pleuropneumoniae* strain S4074 and strain L20 were used as positive controls. *In vitro* grown biofilm of *E. coli* O157:H7 was used as a specificity control. Control biofilms were formed on glass slides by placing a glass slide in a Petri dish containing 25 ml of *A. pleuropneumoniae* culture (22.5 ml BHI with 15 µg NAD ml⁻¹, mixed with 2.5 ml of bacterial culture). The Petri dish was incubated for 24 h at 37 °C with 5% CO₂ (Kiorpes *et al.*, 1990). The glass slide was air-dried (37 °C for 1 h) and gently flamed. Farm drinking water samples (25 µl) were centrifuged at 10 000 r.p.m. for 10 min, and the pellets were spread on a sterile glass slide and air-dried (37 °C for 1 h). The FISH protocol was performed as described by Lehtola *et al.* (2006) as modified by Rodríguez-Núñez *et al.* (2012). Before the hybridization, samples were pre-treated with 5 mM sodium citrate at 94 °C for 5 min. The glass slides were then covered with 30 µl of hybridization solution and with a coverslip. The hybridization solution contained 5 M NaCl, 1 M Tris/HCl, 10% (w/v) SDS, 35% (v/v) formamide, 1.5 µM of each labelled probe (APXIVAN-Forward and APXIVAN-Reverse labelled with 482 fluorescein) and Triton X-

100. Slides were incubated for 18 h at 52 °C. The glass slides were washed for 15 min at 52 °C with a solution containing 15 mM NaCl, 5 mM Tris Base and 0.1% (v/v) Triton X-100. The glass slides were then rinsed in distilled water (52 °C). After hybridization with Apx IV 482 fluorescent probes, *in vitro* biofilms were incubated with 100 µl WGA-Alexa Fluor 594 conjugate (Molecular Probes) (5 µgml⁻¹) diluted in PBS. Every biofilm was incubated for 30 min at room temperature in the dark. Every sample was then washed with water and finally with PBS to eliminate the excess. The samples were covered with ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen). The labelled bacteria were visualized using a confocal microscope (DMI 4000 B; Leica) and images were analysed using the LAS AF image analyser software.

5 **Scanning electron microscopy.** The samples that were FISH-positive and PCR-positive were used to detect the presence of biofilms by SEM. A volume (3 µl) of the drinking water sample was deposited on a slide and air-dried. The dried samples were then processed as described by Silva-Briano *et al.* (2007) as amended by Baum *et al.* (2009). Samples were observed with a JEOL LV-5900 scanning electron microscope. Images were captured with the microscope software.

RESULTS

Detection of *A. pleuropneumoniae* in farm drinking water by PCR

The *apxIV* gene was used to identify *A. pleuropneumoniae* because this toxin is specific for *A. pleuropneumoniae* (Frey, 2003). PCR with primers APXIVAN-Forward and APXIVAN-Reverse yielded a 377 bp fragment (Schuchert *et al.*, 2004; MacInnes *et al.*, 2008) (Fig. 2). DNA from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain S4074 was used as a positive control and reaction without DNA template was used as a negative control. The expected DNA fragment (*A. pleuropneumoniae* S4074) was amplified in the spiked sample (*A. pleuropneumoniae*App-negative) and thus confirmed that the water composition had not interfered with

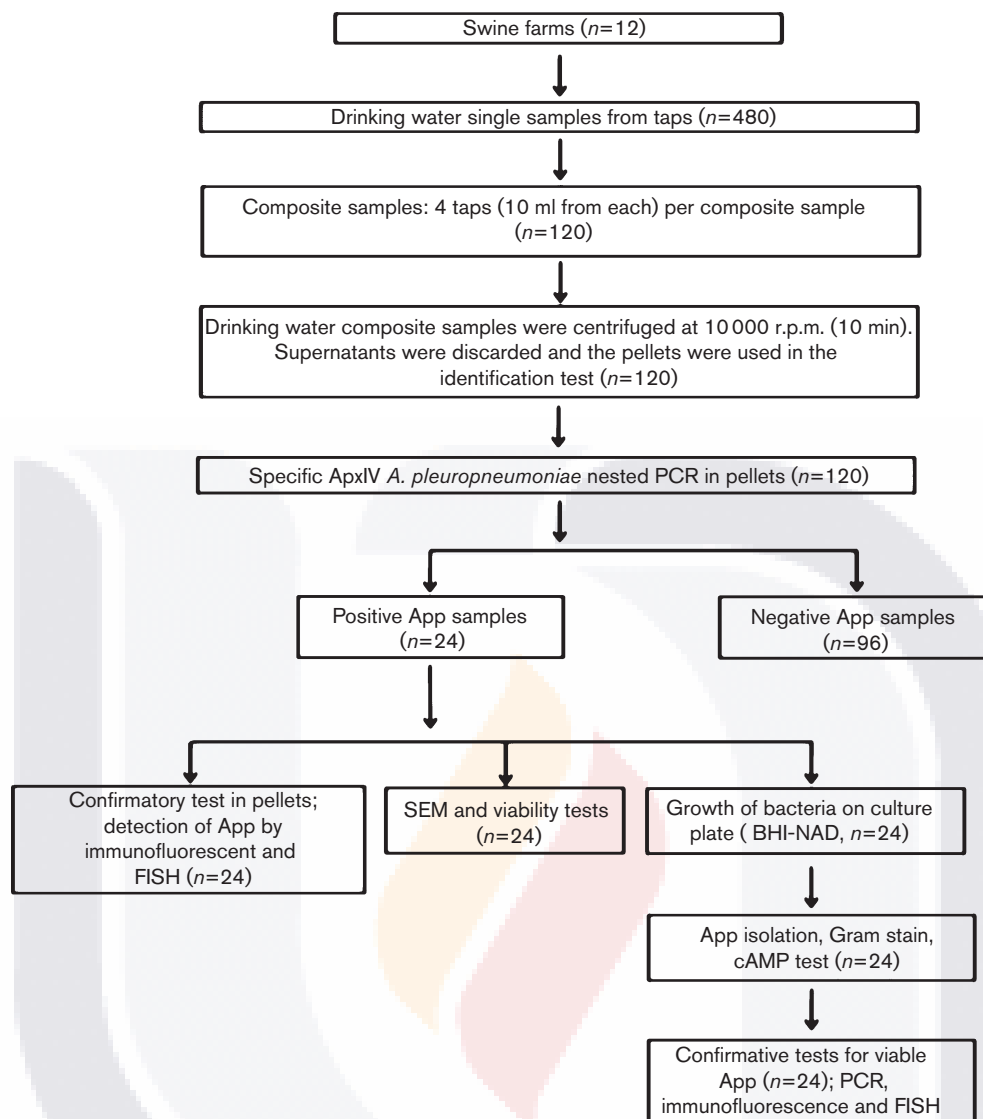


Fig. 1. Flow chart of the methodology used to detect viable *A. pleuropneumoniae* from drinking water-samples collected on swine pig farms. App, *A. pleuropneumoniae*.

the PCR (Fig. 2). Drinking water taps from 12 pig farms were sampled in this study (120 composite samples), and the presence of *A. pleuropneumoniae* was detected by PCR in 24 samples (20%) from six farms (50%) (Table 1; Fig. 3).

Viable bacterial cells in farm drinking water

After identifying water samples that were PCR-positive for *A. pleuropneumoniae*, the viability of the micro-organisms present in the samples ($n=24$) was evaluated. In all the samples, at least 90% of the cells were viable, labelled in green by the Live/Dead BacLight stain in Fig. 4(a); dead cells were labelled in red.

Cultivable *A. pleuropneumoniae* from drinking water

To verify if *A. pleuropneumoniae* detected in the drinking water was cultivable, aliquots of the PCR *A. pleuropneumoniae*-positive samples ($n=24$) were inoculated in BHI agar. Colonies from the BHI agar cultures were subsequently inoculated on blood agar in the presence of a β -haemolytic *S. aureus*. Colonies that exhibited β -haemolysis were suspected to represent *A. pleuropneumoniae* and were characterized further. The characterization included haemolytic activity, the cAMP reaction, urease activity and NAD dependence (Kiorpes *et al.*, 1990). In addition, DNA from the colonies was isolated and used in a PCR assay. These tests confirmed that β -haemolytic colonies represented *A. pleuropneumoniae* (Fig. 3).

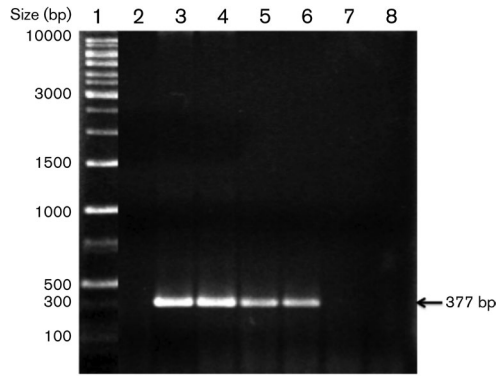


Fig. 2. Analysis of the controls used to confirm the specificity of the nested PCR for *apxIV*. Lane 1, 1 kb ladder; lane 2, reaction without DNA (negative control); lanes 3 and 4, DNA from *A. pleuropneumoniae* strain S4074 (positive control); lanes 5 and 6, *A. pleuropneumoniae*-negative samples spiked with DNA from *A. pleuropneumoniae* strain S4074 (matrix composition control); lanes 7 and 8, DNA from *Mannheimia haemolytica* (specificity control).

The presence of *A. pleuropneumoniae* in water samples was also verified by immunostaining (Fig. 4b–d, Table 1). Drinking water samples and bacteria recovered from the BHI agar were tested and the results confirmed the presence and viability of *A. pleuropneumoniae* in the 24 PCR-positive samples (Figs 3 and 4a). A pure culture of *A. pleuropneumoniae* S4074, drinking water sample of swine farms and *A. pleuropneumoniae* culture of PCR-positive samples were incubated in the absence of the primary antibody and were used as a negative control (Fig. 4b–d,

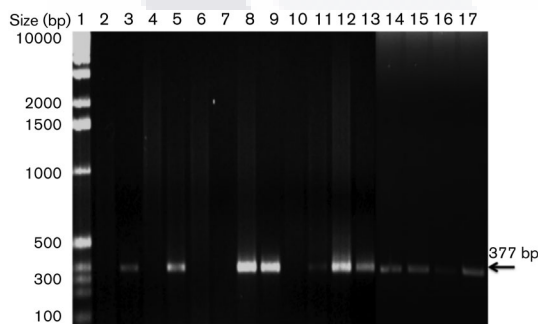


Fig. 3. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by nested *apxIV* PCR in drinking water of pig farms. Lane 1, 1 kb ladder; lane 2, negative control (reaction without DNA template); lanes 3–11, water samples (3, Farm 1; 4, Farm 3; 5, Farm 5; 6, Farm 6; 7, Farm 9; 8, Farm 7; 9, Farm 8; 10, Farm 11; 11, Farm 10); lane 12, positive control (DNA from *A. pleuropneumoniae* strain S4074); lane 13, matrix composition control (*A. pleuropneumoniae*-negative samples spiked with DNA from *A. pleuropneumoniae* strain S4074); lanes 14–17, *A. pleuropneumoniae* cultivable from water samples (14, Farm 1; 15, Farm 5; 16, Farm 8; 17, Farm 10).

lower insets). A pure culture of *A. pleuropneumoniae* was used as a positive control (Fig. 4b).

Biofilms in drinking water samples

SEM was used to visualize biomasses collected from PCR-positive samples ($n=24$). The micrographs showed that biofilm-like structures were present in the water samples (Table 1; Fig. 5)

FISH and WGA labelling.

FISH was used to further confirm the presence of *A. pleuropneumoniae* in the positive samples. Double labelling was done with WGA-Alexa Fluor 594, to show extracellular matrix of exopolysaccharides in biofilms. The specificity of the probe and the technique was confirmed by using *in vitro* grown biofilms of *E. coli* O157:H7 (Fig. 6b), *Bordetella bronchiseptica* strain 274 (data not shown), *Pasteurella multocida* strain 4-4056 (data not shown) and *Haemophilus parasuis* strain Nagasaki (data not shown). As expected, these biofilms were not labelled with the fluorescent *Apx IV* DNA probe, but they were labelled with WGA-Alexa Fluor 594 (Fig. 6b). Furthermore, *in vivo* biofilms formed by *A. pleuropneumoniae* strain S4074 and strain L20 were labelled as expected by the *Apx IV* DNA probe and also showed extracellular matrix (Fig. 6c, d). Additionally, autofluorescence was not detected in *A. pleuropneumoniae* biofilm and water samples that lacked the fluorescent probe (Fig. 6a, h). Green fluorescence was detected in all biofilms isolated from PCR-positive samples and in cultured bacteria, indicating the presence of *A. pleuropneumoniae* (Table 1; Fig. 6e–g), as well as the presence of extracellular matrix.

DISCUSSION

A. pleuropneumoniae was detected by nested PCR in the drinking water of six farms of the State of Aguascalientes, Mexico. Twenty per cent of the composite water samples (24 of 120 samples) were positive for *A. pleuropneumoniae* (Farms 1, 2, 5, 7 and 10, Table 1 and Fig. 3). Pigs from the farms where samples were collected did not have any clinical signs of an *A. pleuropneumoniae* infection. However, the presence of *A. pleuropneumoniae* was previously detected by PCR in nasal swab samples obtained from farms in Aguascalientes. Furthermore, post-mortem examination has revealed that 40% of pigs coming from the state of Aguascalientes have lesions associated with an *A. pleuropneumoniae* infection (data not shown).

Immunostaining and FISH confirmed the presence of *A. pleuropneumoniae* in the 24 PCR-positive samples. Furthermore, the results showed that *A. pleuropneumoniae* was viable and cultivable in all PCR-positive samples. They also confirm the formation of extracellular matrix of exopolysaccharides associated with biofilms formed by strains isolated from farm drinking water samples. The

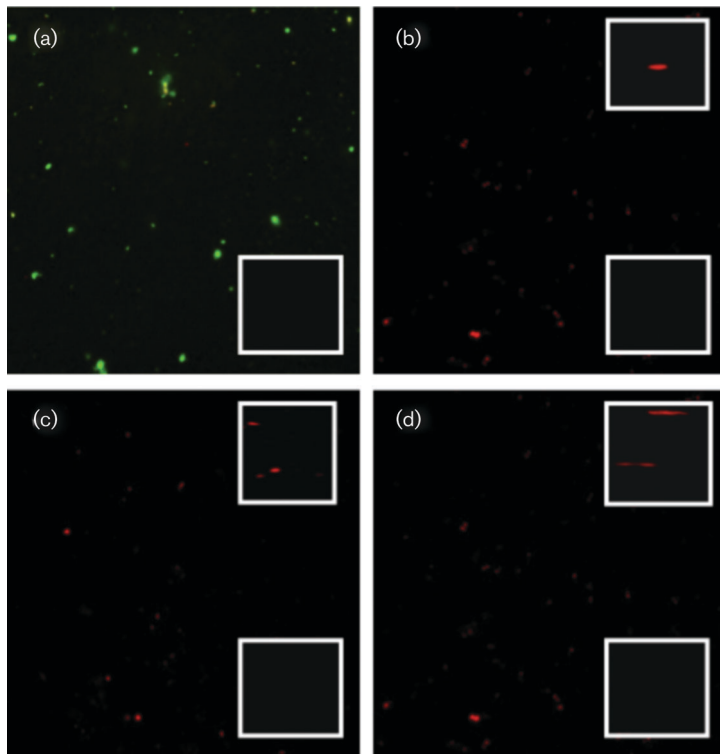


Fig. 4. *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water samples of pig farms. (a) Live–dead stain of drinking water samples (green cells: alive, red cells: dead); the inset shows negative control without kit. (b–d) Immunostaining using a specific polyclonal antibody and a secondary antibody labelled with Alexa Fluor 594. (b) Pure culture of *A. pleuropneumoniae* (positive control). (c) Detection of *A. pleuropneumoniae* in a drinking water sample of swine farms. (d) Detection of *A. pleuropneumoniae* in a PCR-positive sample cultured on BHI agar (Farm 1 is shown); upper insets show close up of bacteria; lower insets show negative control without anti-*A. pleuropneumoniae* antibody.

transmission of *A. pleuropneumoniae* is thought to occur only by direct contact between pigs or by aerosols over

short distances (Kiorpes *et al.*, 1990; MacInnes *et al.*, 2008). However, Assavacheep & Rycroft (2013) demonstrated that *A. pleuropneumoniae* can survive in aqueous solutions and on hydrophobic surfaces, and that the presence of NaCl and mucin enhanced its survival. The presence of viable *A. pleuropneumoniae* in the environment surrounding pig farms, especially drinking water, and the role of the environment *A. pleuropneumoniae* in transmission of the bacterium have yet to be investigated thoroughly.

Bacteria use biofilms as a strategy to survive in the environment. Biofilm formation is also considered a virulence factor in pathogenic bacteria (Li *et al.*, 2011). In their natural setting, biofilms are multi-species bacterial communities attached to a surface and enclosed in an exopolysaccharide matrix (Lindsay & von Holy, 2006; Jacques *et al.*, 2010; Labrie *et al.*, 2010). Several studies have shown that pathogenic bacteria can use biofilms as a strategy to survive and spread in water systems. Gião *et al.* (2010) demonstrated that *Helicobacter pylori* persists inside biofilms when water is treated with low concentrations of chloride (0.2 and 1.2 mg l⁻¹). Kamruzzaman *et al.* (2010) confirmed that *Vibrio cholerae* uses biofilms to survive and spread within water systems. *E. coli* (Shikuma & Hadfield, 2010), *V. cholerae* (Cooper & Hanlon, 2010), *Legionella* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* (Mena & Gerba, 2009) also use biofilms as a strategy to survive in the environment. Furthermore, environmental *Mycobacterium*, which are also opportunistic pathogens,

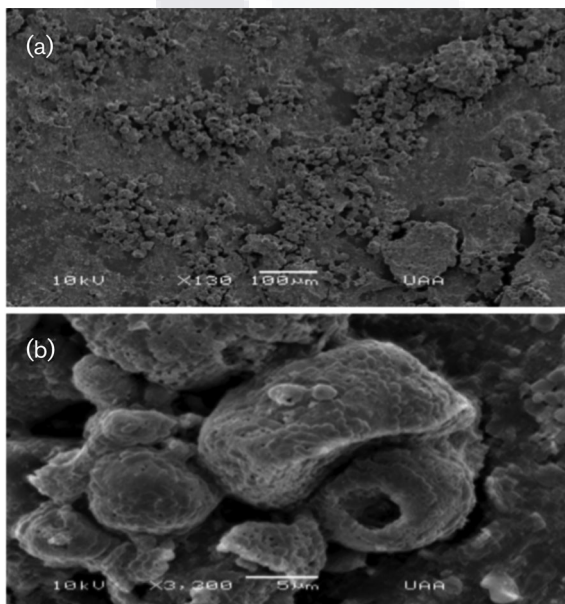


Fig. 5. Scanning electron micrographs of biofilms found into the drinking water of Farm 1. High magnification reveals the typical tower structure of a mature biofilm (a, 130×; b, 3200×).

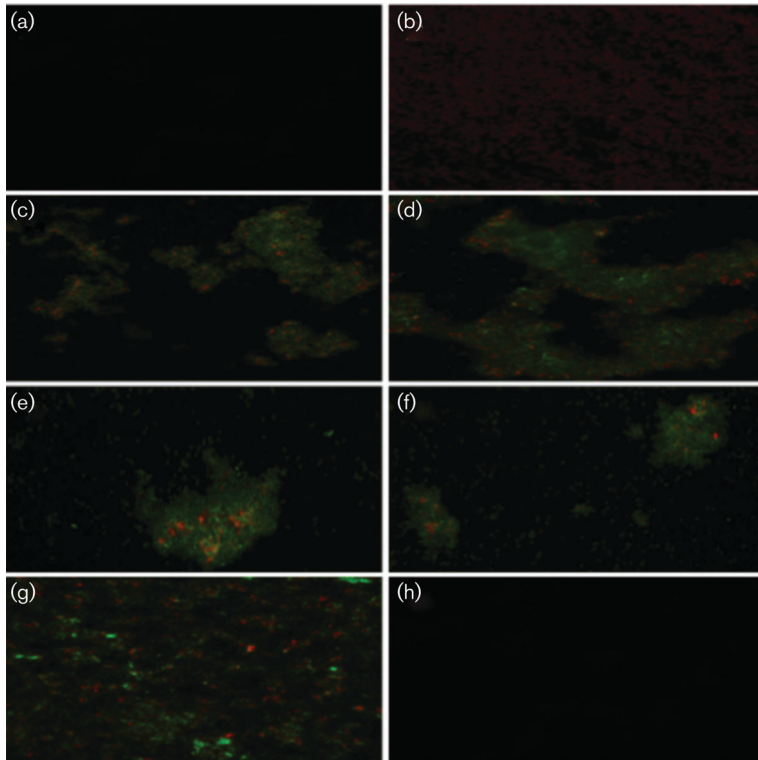


Fig. 6. *A. pleuropneumoniae* detected by FISH in the biofilms recovered from drinking water taps of swine farms (60× photomicrographs are shown). Two labellings were performed: *A. pleuropneumoniae*-specific probe in green (ApX IV 482 green fluorescent), and extracellular matrix probe in red (WGA–Alexa Fluor 594 conjugate). (a) *A. pleuropneumoniae* biofilm without the fluorescent probes (negative control). (b) *Escherichia coli* *in vitro*-grown biofilm with both fluorescent probes (specificity control). (c) *A. pleuropneumoniae* strain S4074 *in vitro*-grown biofilm with both fluorescent probes (positive control 1). (d) *A. pleuropneumoniae* strain L20 *in vitro*-grown biofilm with both fluorescent probes (positive control 2). (e, f) PCR-positive water samples with both fluorescent probes (e, Farm 5; f, Farm 7). (g) Biofilm of cultivable bacteria from PCR-*A. pleuropneumoniae*-positive water samples (Farm 8) with both fluorescent probes. (h) PCR-*A. pleuropneumoniae*-positive water sample (Farm 5) without the fluorescent probes (water samples as negative control).

use biofilms in terrestrial and aquatic environments for persistence. *Mycobacterium* use biofilms to persist in their reservoirs (Vaerewijck *et al.*, 2005). It has been recently reported that several strains of *A. pleuropneumoniae* are able to form biofilms *in vitro* (Izano *et al.*, 2007; Bossé *et al.*, 2010; Labrie *et al.*, 2010; Grasteau *et al.*, 2011). *A. pleuropneumoniae* produces a polysaccharide matrix composed of a polymer of β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamine called PGA. The biofilm matrix polymer produced by *A. pleuropneumoniae* is also found in the biofilm of *E. coli*, *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (Izano *et al.*, 2007). Using SEM and FISH analysis and WGA labelling, a biofilm-like structure was detected in *A. pleuropneumoniae*-positive samples and this suggests that *A. pleuropneumoniae* may use biofilms to survive in the drinking water. Alternatively, *A. pleuropneumoniae* might be able to become incorporated into multispecies biofilms, as observed in other bacterial pathogens (Brockmeier *et al.*, 2003; MacInnes *et al.*, 2008).

To the best of our knowledge, our study is the first to show that *A. pleuropneumoniae* is present and viable in the drinking water of pig farms. Additionally, we observed that *A. pleuropneumoniae* could survive in water for at least 3 weeks at 20 °C in the laboratory (data not shown). In conclusion, our results have shown that PCR allowed the detection of *A. pleuropneumoniae* in drinking water of pig farms and that the *A. pleuropneumoniae* in the water

samples was viable and cultivable. The *A. pleuropneumoniae*-positive samples represented 20% of the samples collected ($n=120$) from six (50%) of 12 randomly selected swine farms. Overall, our data indicate that *A. pleuropneumoniae* is capable of survival in water samples within biofilm-like structures. However, the relationship between the presence of *A. pleuropneumoniae* in drinking water of swine farms, its dispersion and its virulence needs more extensive research.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Araceli Adabache and Keila Alvarado for technical assistance with SEM and confocal microscopy, respectively. This work was supported by a discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to M.J. and grant FOMIX-AGS-2005-01-15051 to A. L. G.-B.

REFERENCES

- Archambault, M., Labrie, J., Rioux, C. R., Dumas, F., Thibault, P., Elkins, C. & Jacques, M. (2003). Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can J Vet Res* **67**, 271–277.
- Assavacheep, P. & Rycroft, A. N. (2013). Survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outside the pig. *Res Vet Sci* **94**, 22–26.

- Baum, M. M., Kainović, A., O’Keeffe, T., Pandita, R., McDonald, K., Wu, S. & Webster, P. (2009). Characterization of structures in biofilms formed by a *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *BMC Microbiol* **9**, 103–109.
- Bossé, J. T., Sinha, S., Li, M. S., O’Dwyer, C. A., Nash, J. H., Rycroft, A. N., Kroll, J. S. & Langford, P. R. (2010). Regulation of *pga* operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by σ^E and H-NS. *J Bacteriol* **192**, 2414–2423.
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J. & Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD[®] BacLight[™]: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* **37**, 77–86.
- Brockmeier, S., Halbur, P. & Thacker, E. (2003). Porcine respiratory disease complex. In *Polymicrobial Diseases*, pp. 231–258. Edited by K. A. Brogden & J. M. Guthmiller. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Chiers, K., De Waele, T., Pasmans, F., Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. (2010). Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Vet Res* **41**, 65.
- Cochran, W. G. (1977). *Sampling Techniques*, 3rd edn. New York: Wiley.
- Cooper, I. R. & Hanlon, G. W. (2010). Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *J Hosp Infect* **74**, 152–159.
- Douse, F., Thomann, A., Brodard, I., Korczak, B. M., Schlatter, Y., Kuhnert, P., Miserez, R. & Frey, J. (2008). Routine phenotypic identification of bacterial species of the family *Pasteurellaceae* isolated from animals. *J Vet Diagn Invest* **20**, 716–724.
- Frey, J. (2003). Detection, identification, and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Methods Mol Biol* **216**, 87–95.
- Gião, M. S., Azevedo, N. F., Wilks, S. A., Vieira, M. J. & Keevil, C. W. (2010). Effect of chlorine on incorporation of *Helicobacter pylori* into drinking water biofilms. *Appl Environ Microbiol* **76**, 1669–1673.
- Gioia, J., Qin, X., Jiang, H., Clinkenbeard, K., Lo, R., Liu, Y., Fox, G. E., Yerrapragada, S., McLeod, M. P. & other authors (2006). The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: insights into virulence, natural competence, and *Pasteurellaceae* phylogeny. *J Bacteriol* **188**, 7257–7266.
- Grasteau, A., Tremblay, Y. D., Labrie, J. & Jacques, M. (2011). Novel genes associated with biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* **153**, 134–143.
- Guerrero-Barrera, A. L., de la Garza, M., Mondragón, R., García-Cuellar, C. & Segura-Nieto, M. (1999). Actin-related proteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their interactions with actin-binding proteins. *Microbiology* **145**, 3235–3244.
- Gutiérrez-Cantú, F. J., Feria-Velasco, A., Palacios-Arenas, L. N., Alvarado-Estrada, K. N., Avelar-González, F. J., Flores-Reyes, H., Mariel-Cárdenas, J. & Guerrero-Barrera, A. L. (2011). Amelogenin and enamelysin localization in human dental germs. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **47**, 355–360.
- Izano, E. A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Mulks, M. H., Velliagounder, K., Rangunath, C., Kher, W. B., Ramasubbu, N., Jabbouri, S. & other authors (2007). Poly-*N*-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* **43**, 1–9.
- Jacobsen, I., Hennig-Pauka, I., Baltes, N., Trost, M. & Gerlach, G. F. (2005). Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence. *Infect Immun* **73**, 226–234.
- Jacques, M., Aragon, V. & Tremblay, Y. D. (2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Anim Health Res Rev* **11**, 97–121.
- Kamruzzaman, M., Udden, S. M. N., Cameron, D. E., Calderwood, S. B., Nair, G. B., Mekalanos, J. J. & Faruque, S. M. (2010). Quorum-regulated biofilms enhance the development of conditionally viable, environmental *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1588–1593.
- Kim, J. M., Jung, D. I., Eom, Y. J., Park, S. M., Yoo, H. S., Jang, Y. S., Yang, M. S. & Kim, D. H. (2010). Surface-displayed expression of a neutralizing epitope of ApxIIA exotoxin in *Saccharomyces cerevisiae* and oral administration of it for protective immune responses against challenge by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 1362–1367.
- Kiorpes, A. L., MacWilliams, P. S., Schenkman, D. I. & Bäckström, L. R. (1990). Blood gas and hematological changes in experimental peracute porcine pleuropneumonia. *Can J Vet Res* **54**, 164–169.
- Labrie, J., Pelletier-Jacques, G., Deslandes, V., Ramjeet, M., Auger, E., Nash, J. H. E. & Jacques, M. (2010). Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res* **41**, 3–10.
- Lehtola, M. J., Torvinen, E., Miettinen, I. T. & Keevil, C. W. (2006). Fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in potable-water biofilms. *Appl Environ Microbiol* **72**, 848–853.
- Li, L., Zhou, R., Li, T., Kang, M., Wan, Y., Xu, Z. & Chen, H. (2008). Enhanced biofilm formation and reduced virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae luxS* mutant. *Microb Pathog* **45**, 192–200.
- Li, L., Xu, Z., Zhou, Y., Li, T., Sun, L., Chen, H. & Zhou, R. (2011). Analysis on *Actinobacillus pleuropneumoniae* LuxS regulated genes reveals pleiotropic roles of LuxS/AI-2 on biofilm formation, adhesion ability and iron metabolism. *Microb Pathog* **50**, 293–302.
- Lindsay, D. & von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* **64**, 313–325.
- MacInnes, J. I., Gottschalk, M., Lone, A. G., Metcalf, D. S., Ojha, S., Rosendal, T., Watson, S. B. & Friendship, R. M. (2008). Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Can J Vet Res* **72**, 242–248.
- Mena, K. D. & Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol* **201**, 71–115.
- Ohba, T., Shibahara, T., Kobayashi, H., Takashima, A., Nagoshi, M. & Kubo, M. (2010). Granulomatous lymphadenitis associated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in slaughter barrows. *Can Vet J* **51**, 733–737.
- Rayamajhi, N., Shin, S. J., Kang, S. G., Lee, D. Y., Ahn, J. M. & Yoo, H. S. (2005). Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *J Vet Diagn Invest* **17**, 359–362.
- Reiner, G., Fresen, C., Bronnert, S., Haack, I. & Willems, H. (2010). Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. *J Wildl Dis* **46**, 551–555.
- Rodríguez-Nuñez, J., Avelar-Gonzalez, F. J., Marquez, F., Rivas-Santiago, B., Quiñones, C. & Guerrero-Barrera, A. L. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* complex detected by modified fluorescent in situ hybridization in lymph nodes of clinical samples. *J Infect Dev Ctries* **6**, 58–66.

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Schuchert, J. A., Inzana, T. J., Angen, O. & Jessing, S. (2004). Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **42**, 4344–4348.

Shikuma, N. J. & Hadfield, M. G. (2010). Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Biofouling* **26**, 39–46.

Silva-Briano, M., Martínez-Hernández, S. L., Adabache-Ortiz, A., Ventura-Juárez, J., Salinas, E. & Quintanar, J. L. (2007). Ultrastructural analysis and identification of membrane proteins in the free-living amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 225–228.

Vaerewijck, M. J., Huys, G., Palomino, J. C., Swings, J. & Portaels, F. (2005). *Mycobacteria* in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 911–934.

Wagner, T. K. & Mulks, M. H. (2007). Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* leucine-responsive regulatory protein and its involvement in the regulation of in vivo-induced genes. *Infect Immun* **75**, 91–103.

Xie, F., Zhang, M., Li, S., Du, C., Sun, C., Han, W., Zhou, L. & Lei, L. (2010). Differential gene expression in the pathogenic strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1 and 3. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 789–797.

Xu, Z., Zhou, Y., Li, L., Zhou, R., Xiao, S., Wan, Y., Zhang, S., Wang, K., Li, W. & other authors (2008). Genome biology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* JL03, an isolate of serotype 3 prevalent in China. *PLoS ONE* **3**, e1450.

Edited by: D. L. Gally



Dear Authors,

Please find enclosed a proof of your article for checking.

When reading through your proof, please check carefully authors' names, scientific data, data in tables, any mathematics and the accuracy of references. Please do not make any unnecessary changes at this stage. All necessary corrections should be marked on the proof at the place where the correction is to be made; please write the correction clearly in the margin (if in the text they may be overlooked).

Any queries that have arisen during preparation of your paper for publication are listed below and indicated on the proof. Please provide your answers when returning your proof.

Please return your proof by email (micro.proofs@sgm.ac.uk) or Fax [+44 (0)118 988 1834] within 2 days of receipt.

Query no.	Query
1	Please give the g-value for the centrifugation speed (step 4 on Fig. 1).
2	The in-text citation "Frey, 2010" was not in the reference list. The year has been amended. Is this OK (here and below)?
3	Author: please confirm that you measured OD at 600 nm.
4	Author: 482 fluorescein. Please confirm units
5	Please confirm that the units for the conjugate are correct as $\mu\text{g ml}^{-1}$.
6	Reference "Li, Zhou, Li, Kang, Wan, Xu, Chen, 2008" is not cited in the text. Please add an in-text citation or delete the reference.

Ordering reprints for SGM journals

As a result of declining reprint orders and feedback from many authors who tell us they have no use for reprints, **SGM no longer provides free reprints to corresponding authors**; instead, corresponding authors will receive two emails:

- i) An email including a link to download the published PDF of their paper. You can forward this link to co-authors or others, and they can also use it to download the published PDF. The link can be used up to 25 times. This email will be sent out at around the time your article is published online.
- ii) An email including a link to the SGM Reprint Service. You can forward this email to your co-authors if you wish, so that they can order their own reprints directly, or to your finance or purchasing department, if orders are placed centrally. This email will be sent out at around the time that your article is finalized for printing.

When you click on the link in this second email, you will be taken to an order page to place your reprint order. Like most online ordering sites, it is necessary to set up an account and provide a delivery address while placing your order, if you do not already have an account. Once an account and delivery address have been set up, these details will be stored by the system for use with future orders. Payments can be made by credit card, PayPal or purchase order.

As reprint orders are despatched by courier, there is a charge for postage and packing.

SUMMARY

- You can create or update your reprint account at any time at <http://sgm-reprints.charlesworth.com/>
- You will be sent an email when the reprints of this paper are ready for ordering
- **You cannot order reprints of this paper before this email has been sent**, as your paper will not be in the system
- Reprints can be ordered at any time after publication
- You will also receive an email with a link to download the PDF of your published paper

The reprint ordering details will be emailed to the author listed as the corresponding author on the journal's manuscript submission system. If your paper has been published (the final version, not the publish-ahead-of-print version) but you have not received this notification, email reprints@sgm.ac.uk quoting the journal, paper number and publication details.

If you have any questions or comments about the reprint-ordering system or about the link to your published paper, email reprints@sgm.ac.uk