



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
POSGRADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGIAS AGRICOLAS, PECUARIAS  
Y DE LOS ALIMENTOS

TESIS

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN  
CERDOS DE GRANJAS PORCICOLAS DEL ESTADO DE  
AGUASCALIENTES

Que para obtener el título de  
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS

PRESENTA

M.V.Z. MARCELA MORFIN MATA

COMITE TUTORAL

Tutor: Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera

Cotutor: Dr. Teódulo Quezada Tristán

Asesor: Dr. Arturo Valdivia Flores

AGUASCALIENTES 2009



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
POSGRADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGIAS AGRICOLAS, PECUARIAS  
Y DE LOS ALIMENTOS

TESIS

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN  
CERDOS DE GRANJAS PORCICOLAS DEL ESTADO DE  
AGUASCALIENTES

Que para obtener el título de  
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS

PRESENTA

M.V.Z. MARCELA MORFIN MATA

*El presente documento fue revisado, presentado, defendido y aprobado  
en el examen de grado correspondiente”*

Tutor: Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera

\_\_\_\_\_

Cotutor: Dr. Teódulo Quezada Tristán

\_\_\_\_\_

Asesor: Dr. Arturo Valdivia Flores

\_\_\_\_\_

AGUASCALIENTES 2009

## DEDICATORIAS

A través de mi acelerada vida, en ocasiones es difícil demostrar el afecto y/o agradecimiento a las personas más importantes en mi vida. En primer lugar dedico este trabajo a mi padre Héctor Germán Morfín Flores, por su apoyo incondicional además de que gran parte de lo que soy se lo debo a él.

En este esfuerzo de superación y trabajo se lo dedico de una manera muy especial a mis profesores Alma Lilián Guerrero Barrera, Teódulo Quezada Tristán, Arturo Valdivia Flores, A mis compañeros y amigos: Víctor Loera, Cristina Garcidueñas, Cesar Quiñones y Abril Miranda; quienes en todo momento estuvieron para ayudar en gran parte para la realización de éste trabajo.

Este trabajo se lo dedico a mis compañeros y amigos, ya que siempre estuvieron apoyándome en los momentos difíciles, ya que creo firmemente que tener amigos es uno de los mejores dones del ser humano y sobre todo poder conservarlos.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar un profundo agradecimiento a mi padre por haberme brindado e impulsado a tener la formación que ahora tengo; por haber estado siempre a mi lado en momentos difíciles y también en los buenos.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi tutora a la Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera, por su infinita paciencia y por compartir conmigo sus valiosos conocimientos, por haberme alentado en los momentos más difíciles y en momentos en los que estuve a punto de claudicar, lo que me permitió llegar a esta etapa; sin sus consejos hubiera sido imposible concluir de manera exitosa este trabajo.

A la vez también agradezco a los integrantes de mi comité tutorial: el Dr. Teódulo Quezada Tristán, Arturo Valdivia Flores; por haber aceptado compartir conmigo sus conocimientos lo que a la vez nos permitió obtener valiosas experiencias, así como sus importantes consejos para la realización de éste trabajo y en ocasiones asesoría en mi trabajo realizado en la empresa GPM; al Dr. José de Jesús Luna Ruiz, Raúl Ortiz y Vicente Díaz, quienes compartieron conmigo de manera importante sus conocimientos.

Al Dr. Arturo Valdivia Flores y demás doctores que creyeron en mí y me permitieron estar realizando éste proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 203 de Biología Celular y Tisular; Víctor Loera, Cristina Garcidueñas, César Quiñones Valles y Abril Miranda Castañeda que aportaron gran parte de su tiempo y conocimientos para la realización de éste trabajo. A la Universidad Autónoma de Aguascalientes en especial al Centro de Ciencias Agropecuarias.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



M.C. MARIO ALEJANDRO LÓPEZ GUTIÉRREZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E.

Por este medio manifiesto a usted que **Marcela Morfin Mata** alumna del Programa del Posgrado en Ciencias y Tecnologías Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos en nivel maestría, ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de escritura de la tesis titulada **“DETECCIÓN MOLECULAR DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN CERDOS DE GRANJAS PORCICOLAS DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES”**

Por lo anterior no tengo inconveniente en otorgar mi voto *aprobatorio* para la impresión del documento, para que se proceda a completar el proceso de presentación de examen de grado.

Se extiende la presente en la ciudad de Aguascalientes, Al primer día del mes de julio del año dos mil nueve.

ATENTAMENTE

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA  
INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL



M.C. MARIO ALEJANDRO LÓPEZ GUTIÉRREZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
PRESENTE.

Por este medio manifiesto a usted que **Marcela Morfin Mata** alumna del Programa del Posgrado en Ciencias y Tecnologías Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos en nivel maestría, ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de escritura de la tesis titulada “DETECCIÓN MOLECULAR DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN CERDOS DE GRANJAS PORCICOLAS DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES”

Por lo anterior no tengo inconveniente en otorgar mi voto *aprobatorio* para la impresión del documento, para que se proceda a completar el proceso de presentación de examen de grado.

Se extiende la presente en la ciudad de Aguascalientes, a los veintitres del mes de junio del año dos mil nueve.

ATENTAMENTE



DR. TEÓDULO QUEZADA TRISTÁN  
INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



M.C. MARIO ALEJANDRO LÓPEZ GUTIÉRREZ  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
P R E S E N T E.

Por este medio manifiesto a usted que **Marcela Morfin Mata** alumna del Programa del Posgrado en Ciencias y Tecnologías Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos en nivel maestría, ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de escritura de la tesis titulada “DETECCIÓN MOLECULAR DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* EN CERDOS DE GRANJAS PORCICOLAS DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES”

Por lo anterior no tengo inconveniente en otorgar mi voto *aprobatorio* para la impresión del documento, para que se proceda a completar el proceso de presentación de examen de grado.

Se extiende la presente en la ciudad de Aguascalientes, a los veintinueve días del mes de junio del año dos mil nueve.

ATENTAMENTE

DR. ARTURO VALDIVIA FLORES  
INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL



## ÍNDICE GENERAL

	CONTENIDO	PAGINAS
	DEDICATORIAS.	iii
	AGRADECIMIENTOS.	iv
	VOTOS APROBATORIOS.	v
	ÍNDICE GENERAL.	viii
	ÍNDICE DE CUADROS.	x
	ÍNDICE DE FIGURAS.	xi
	ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS.	xii
	RESUMEN.	xiii
	ABSTRACT.	xiv
1.	<b>INTRODUCCIÓN.</b>	1
2.	<b>REVISIÓN DE LITERATURA.</b>	3
2.1.	LA PORCICULTURA EN MÉXICO.	3
2.2.	ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.	8
2.3.	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae (App).</i>	11
2.3.1.	Antecedentes.	11
2.3.2.	Características.	12
2.4.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	24
2.4.1.	Proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	25
2.4.2.	Etapas básicas en la amplificación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	26
2.4.3.	Ventajas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. (PCR)	27

3.	<b>HIPÓTESIS.</b>	29
4.	<b>OBJETIVO GENERAL.</b>	30
5.	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	31
6.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	32
6.1.	LUGAR DE ESTUDIO.	32
6.2.	CARACTERÍSTICAS DE LAS GRANJAS PORCINAS.	35
6.3.	CERDOS DEL ESTUDIO.	35
6.4.	TAMAÑO DE LA MUESTRA.	36
6.5.	OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE MUESTRAS.	36
6.6.	TÉCNICA PARA PCR.	37
6.6.1.	Extracción del ADN.	37
6.6.2.	Preparación del PCR anidado y Amplificación.	37
6.6.3.	Análisis de resultados.	38
7.	<b>RESULTADOS.</b>	39
8.	<b>DISCUSIONES.</b>	42
9.	<b>CONCLUSIONES.</b>	45
10.	<b>LITERATURA CITADA.</b>	46

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	CONTENIDO	PAGINAS
1	Ganado sacrificado a nivel nacional (Número de cabezas).	4
2	Producción de carne en canal a nivel nacional (en toneladas) (Estructura porcentual).	4
3	Estructura porcentual de acuerdo a toneladas de carne en canal producidas (Principales estados productores).	5
4	Ganado porcino. Valores en miles de pesos a precios corrientes (Estructura porcentual de acuerdo al valor de la producción de carne en canal).	6
5	Ganado sacrificado en el estado de Aguascalientes (Número de cabezas).	7
6	Producción de carne en canal (en toneladas) (Estructura porcentual).	7
7	Producción de carne en canal (Valores en miles de pesos a precios corrientes) (Estructura porcentual).	8
8	Características de las granjas porcinas.	35
9	Secuencia de los oligonucleótidos usados en el PCR realizado para <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	38

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PAGINAS
1	Ubicación de las 12 granjas porcícolas.	32
2	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % para PCR anidado APX IV; <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	39
3	Distribución de frecuencias de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en las 180 muestras de sangre obtenida.	40
4	Distribución de la frecuencia de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , por granja muestreada.	41

## ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	Acido Desoxirribonucleico Complementario
App	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Apx	Exotoxina de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
ARN	Acido Ribonucleico
CAMP	Prueba de Christie-Atkins-Munch-Petersen
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP'S	Nucleótidos libres
EDTA	Etilendiamintetraacético
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
Fw	Forward primer
HE	Hematoxilina y eosina
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisacárido
MTM	Marcador de tamaño molecular
NAD	Dinucleótido de Nicotina y Adenina
PaIA	Lipoproteína asociada al Peptidoglicano
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCV-2	Circovirus Porcino tipo 2
PP	Pleuroneumonía Porcina
PRRS	Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo
Rw	Reverse primer
TCDI	Dosis infectantes en cultivo de Tejidos
TSA	Agar tripticasa soya

## RESUMEN

**Detección molecular de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdos de granjas porcícolas del estado de Aguascalientes**

**Molecular detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs of porcine farms of the state of Aguascalientes**

Morfín Mata, Marcela; Guerrero Barrera, Alma Lilián; Quezada Tristán, Teóduo; Valdivia Flores, Arturo.

En los sistemas de producción del ganado porcino se encuentran agentes patógenos que afectan directamente a los parámetros productivos teniendo un impacto económico (Choi *et al.*, 2003). Dentro de estas afecciones se encuentran las enfermedades del complejo respiratorio que ha sido identificado como el principal síndrome que ocasiona mermas a la producción de ganado porcino en explotaciones comerciales (Cho *et al.*, 2006). Éste complejo se encuentra asociado con varios agentes etiológicos presentándose constantemente en las granjas. El objetivo de éste estudio fue realizar la detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en muestras de sangre completa de cerdos en granjas porcícolas del estado de Aguascalientes, mediante la metodología de la Reacción en cadena de la Polimerasa usando oligonucleótidos específicos. Se tomaron 180 muestras de sangre completa de cerdos en 12 granjas del estado de Aguascalientes. En los resultados obtenidos se observó que *A. pleuropneumoniae* está presente en sangre de cerdo en el 100% de las granjas; lo que sugiere, que los cerdos actúan como portadores sanos; por lo tanto el problema respiratorio causado por *A. pleuropneumoniae* es considerado un problema endémico (Hernández *et al.*, 2002).

**Palabras clave:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PCR, cerdos.

## ABSTRACT

### **Molecular detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs of porcine farms of the state of Aguascalientes**

In the production systems of the pig herds are pathogenic agents that they directly affect the productive parameters having an economic impact (Choi *et al.*, 2003). Within these affections are the diseases of the respiratory complex that has been identified like the main syndrome that causes decreases to the production of pig herds in commercial operations (Cho *et al.*, 2006). This complex is associated with several etiological agents constantly appearing in the farms.

The objective of this study was to realize the detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, in complete blood samples of pigs in porcine farms of the state of Aguascalientes, doing specific the methodology of the oligonucleotidos Chain reaction of the Polymerase. 180 complete blood samples were taken from pigs in 12 farms of the state of Aguascalientes. In the obtained results it was observed that *A. pleuropneumoniae* is present in blood of pig in the 100% of the farms; reason why it is suggested, that the pigs act like healthy carriers; therefore the respiratory problem caused by *A. pleuropneumoniae* considers an endemic problem (Hernández *et al.*, 2002).

**Word keys:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PCR, pigs.

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria porcícola es la tercera en importancia dentro del sub-sector pecuario en el estado de Aguascalientes (Germán *et al.*, 2005), además se ha convertido en un centro de acopio para cerdos provenientes de diferentes partes del país. Desde el punto de vista epidemiológico esto ocasiona que continuamente se mezclen dentro de las granjas cerdos de muy diverso origen; razón por la cual, se pueden encontrar diversos agentes patógenos causantes de enfermedades respiratorias; provocando como consecuencia un aumento en la morbilidad, mortalidad así como un aumento en la conversión alimenticia de los cerdos (Mondaca *et al.*, 2006). Además de pérdidas económicas considerables para los productores, pues puede llegar a afectar la capacidad reproductiva de los animales.

Datos de PigMon, un programa de monitoreo utilizado en Minnesota que evalúa lesiones en matadero de cientos de granjas del medio-oeste americano, indican que un 97% de las granjas son afectadas con neumonía, con más de un 70% de los animales muestreados presentando lesiones (Davies *et al.*, 1993). Dada la importancia de las enfermedades respiratorias que afectan al cerdo, se han implementado varias pruebas diagnósticas, dentro de las cuales, se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) que consiste en amplificar rápidamente el ADN, además de ser una técnica muy sensible y específica, ofreciendo ventajas sobre técnicas de diagnóstico tradicionales (Torremorell *et al.*, 2006).

El presente proyecto propone determinar la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en 12 granjas porcícolas del estado de Aguascalientes, utilizando métodos moleculares, para detectar con mayor sensibilidad y especificidad (Altcheh *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007); ya que hasta la fecha no existe un estudio formal. Como el propósito del presente trabajo es detectar a lo largo de un año y medio la presencia de *A. plueropneumoniae*, nos interesa no subestimar los patógenos presentes en las granjas porcícolas, por lo tanto elegimos el diagnóstico molecular por PCR.



## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. LA PORCICULTURA EN MÉXICO

La porcicultura en México es una de las principales actividades económicas del sub-sector pecuario. El consumo de carne de cerdo ocupa el tercer lugar a nivel nacional (Germán *et al.*, 2005). La población porcina en México es de aproximadamente 15'128,085 animales, de los cuales se calcula que alrededor del 60% son cerdos de granja, criados en condiciones altamente tecnificadas de confinamiento estricto, en espacios reducidos y sin ningún contacto con la tierra, aguas fluviales o estancadas.

De acuerdo a estadísticas reportadas por el INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, 2005), el cerdo es el animal que más se sacrifica en los rastros estatales (CUADRO 1), esto sin contar aquellos datos no registrados debido al sacrificio ilegal o al realizado en el ámbito familiar. En toneladas de carne en canal, el ganado porcino sacrificado representa aproximadamente el 30% de la producción total de carne en los rastros estatales del país (CUADRO 2). El ingreso nacional por esta producción en 2005 fue de \$8 422 655 000.00 (ocho mil cuatrocientos veintidós millones seiscientos cincuenta y cinco mil pesos MN), (CUADRO 3). Los estados que producen mayor cantidad de porcinos, con su porcentaje correspondiente sobre la producción nacional, se muestran en el CUADRO 4.

CUADRO 1. Ganado sacrificado a nivel nacional del período del 2000 al 2005 (Número de cabezas). Fuente: (INEGI, 2005) (formato modificado).

CONCEPTO	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<b>GANADO PORCINO</b>	4 887316	5 110724	5 118075	5 082637	4 808893	4 707199
<b>Ganado bovino</b>	3 018923	3 086651	2 942270	3 084837	3 100150	2 747560
<b>Ganado ovino</b>	169 025	160 064	165 981	187 325	193 414	212 329
<b>Ganado caprino</b>	410 417	393 672	378 329	304 817	222 327	175 914

CUADRO 2. Producción de carne en canal a nivel nacional (en toneladas) del período del 2000 al 2005. (Estructura porcentual). Fuente: (INEGI, 2005) (formato modificado).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<b>TOTAL</b>	947 829 (100%)	988 632 (100%)	979 421 (100%)	1 024 033 (100%)	1 000 638 (100%)	923 546 (100%)
<b>GANADO PORCINO</b>	339 801 (35.9%)	354 531 (35.9%)	362 224 (36.9%)	353 143 (34.5%)	324 748 (32.4%)	307 640 (33.3%)
<b>Ganado bovino</b>	598 734 (63.2%)	625 179 (63.2%)	606 909 (61.9%)	661 696 (64.6%)	668 099 (66.8%)	608 388 (65.9%)
<b>Ganado ovino</b>	3 077 (0.32%)	2 875 (0.29%)	3 067 (0.31%)	3 621 (0.35%)	4 016 (0.40%)	4 389 (0.48%)
<b>Ganado caprino</b>	6 217 (0.66%)	6 047 (0.61%)	7 221 (0.74%)	5 573 (0.54%)	3 775 (0.38%)	3 129 (0.34%)

CUADRO 3. GANADO PORCINO. Valores en miles de pesos a precios corrientes en el año 2005. (Estructura porcentual de acuerdo al valor de la producción de carne en canal). Formato modificado (INEGI, 2005).

ENTIDAD FEDERATIVA	2005
TOTAL	8 422 655 (100%)
Jalisco	1 448 236 (17.2%)
Estado de México	1 283 663 (15.2%)
Guanajuato	595 618 (7.1%)
Michoacán	635 670 (7.6%)
Puebla	478 359 (5.7%)
Yucatán	472 132 (5.6%)
Veracruz	441 539 (5.2%)
Querétaro	272 170 (3.2%)
Guerrero	284 590 (3.4%)
AGUASCALIENTES	271 864 (3.2%)
Otros	2 238 814 (26.6%)

Aguascalientes ocupa el 10<sup>o</sup> lugar en la producción de porcinos, aportando el 3.07% de la producción nacional (CUADRO 4).

CUADRO 4. GANADO PORCINO. Estructura porcentual de acuerdo a toneladas de carne en canal producidas en el año 2005. (Principales estados productores). Formato modificado (INEGI, 2005).

<b>ENTIDAD FEDERATIVA</b>	<b>2005</b>
TOTAL	100.00
Jalisco	16.9
Estado de México	15.5
Guanajuato	8.3
Michoacán	6.9
Puebla	5.8
Yucatán	5.6
Veracruz	5.2
Querétaro	3.5
Guerrero	3.1
AGUASCALIENTES	3.1
Otros	26.1

En Aguascalientes, durante el año de 2005 se sacrificaron 145 567 cerdos, representando el 50.23% de la producción de toneladas de carne en canal en los rastros estatales (INEGI, 2005) (Ver CUADRO 5 y 6 respectivamente), que significaron un ingreso de \$271 846 000.00 (doscientos setenta y un millones ochocientos cuarenta y seis mil pesos MN) (Ver CUADRO 7).

CUADRO 5. Ganado sacrificado en el estado de Aguascalientes en el período del 2000 al 2005. (Número de cabezas). Fuente: (INEGI, 2005) (formato modificado).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<b>GANADO PORCINO</b>	132 708	146 779	155 507	158 390	144 471	145 567
<b>Ganado bovino</b>	51 871	51 588	44 115	48 290	43 534	37 080
<b>Ganado ovino</b>	8 374	7 547	9 437	9 503	10 159	17 441
<b>Ganado caprino</b>	19 402	16 446	14 504	15 522	16 599	6 591

CUADRO 6. Producción de carne en canal (en toneladas) (Estructura porcentual). Fuente: (INEGI, 2005) (formato modificado).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<b>TOTAL</b>	19 781 (100%)	20 763 (100%)	19 998 (100%)	21 188 (100%)	19 631 (100%)	18 790 (100%)
<b>GANADO PORCINO</b>	9 380 (47.42%)	10 204 (49.14%)	11 019 (55.10%)	9 962 (47.02%)	9 463 (48.20%)	9 437 (50.23%)
<b>Ganado bovino</b>	9 917 (50.13%)	10 141 (48.84%)	8 510 (42.55%)	10 730 (50.64%)	9 639 (49.10%)	8 826 (46.97%)
<b>Ganado ovino</b>	167 (0.85%)	147 (0.71%)	219 (1.10%)	225 (1.06%)	239 (1.22%)	412 (2.19%)
<b>Ganado caprino</b>	317 (1.60 %)	271 (1.31%)	250 (1.25%)	271 (1.28%)	290 (1.48%)	115 (0.61%)

CUADRO 7. Producción de carne en canal en el período del 2000 al 2005. (Valores en miles de pesos a precios corrientes) (Estructura porcentual). Fuente: (INEGI, 2005) (formato modificado).

	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<b>TOTAL</b>	400 857 (100%)	441 265 (100%)	453 974 (100%)	499 393 (100%)	520 150 (100%)	528 379 (100%)
<b>GANADO PORCINO</b>	207 212 (51.7%)	236 249 (53.5%)	265 367 (58.5%)	249 876 (50.0%)	268 834 (51.7%)	271 864 (51.5%)
<b>Ganado bovino</b>	182 823 (45.6%)	195 234 (44.2%)	177 064 (39.0%)	237 169 (47.5%)	238 244 (45.8%)	240 382 (45.5%)
<b>Ganado ovino</b>	3 855 (0.96%)	3 551 (0.81%)	5 526 (1.2%)	5 755 (1.15%)	6 053 (1.16%)	12 996 (2.5%)
<b>Ganado caprino</b>	6 967 (1.7%)	6 231 (1.4%)	6 017 (1.3%)	6 593 (1.3%)	7 019 (1.4%)	3 137 (0.59%)

## 2.2. ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

Debido a que los trastornos respiratorios del cerdo no están considerados como enfermedades de declaración obligatoria, no existen estadísticas oficiales sobre su presentación (Brockmeier *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2003). El estado sanitario de la piara se puede evaluar al tomar muestras de todos los animales, lo cual es innecesario además de costoso. Debido a que la mayoría de las piaras están infectadas con una prevalencia ente moderada (>30%) a elevada ( $\geq 50\%$ ) se considera adecuado muestrear entre cinco y diez cerdos, independientemente del número de animales de las granjas para definir el estado sanitario de la piara (Morilla *et al.*, 1996). Williams *et al.*, (2000) reporta el 90.3% de pulmones lesionados por problemas respiratorios en un estudio realizado en Yucatán; también se ha en México entre el 30 y 60% de los cerdos que llegan a los rastros, presentan lesiones a *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Hernández *et al.*, 2002).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Estudios preliminares realizados en el laboratorio de Biología Celular y Tisular del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, han permitido detectar en el Rastro Municipal de San Francisco de los Romo, infecciones crónicas recurrentes de *A. pleuropneumoniae*, a lo largo del año (Cornejo, 2006; Prieto, 2006). En dicho estudio se muestrearon 64 cerdos, de los cuales 40 de estos se les detectaron lesiones con pleuroneumonía porcina crónica. A 25 de estos pulmones afectados se les realizó inmunolocalización con anticuerpos específicos, donde fueron aisladas 17 cepas, de las cuales 4 fueron analizadas y confirmadas por PCR. Estas evidencias sugieren que las enfermedades respiratorias porcinas tienen una distribución constante en las granjas porcícolas del Estado de Aguascalientes. Sin embargo, no existe un registro de las enfermedades producidas por estos patógenos en el Estado. (Bautista *et al.*, 2003 a y b); lo anterior es un requisito para prevenir su establecimiento en las piaras (Morilla *et al.*, 1996).

Las enfermedades respiratorias del cerdo son comunes en todas las crianzas porcinas del mundo y consideradas de gran importancia económica (Torres, 2000; Choi *et al.*, 2003). En su etiología intervienen diferentes especies de microorganismos, asociados a factores de estrés, provocados por condiciones ambientales y de manejo. Dentro de estas afecciones se encuentran las enfermedades del complejo respiratorio que ha sido identificado como el principal síndrome que ocasiona mermas a la producción de ganado porcino en explotaciones comerciales (Cho *et al.*, 2006). Este término resulta apropiado, ya que las enfermedades de los cerdos son en la mayoría de los casos, resultado de combinaciones de factores ambientales y agentes infecciosos que actúan en conjunto, afectando la función respiratoria (Iglesias y Trujano, 2000); en términos generales se cree que las interacciones de gérmenes son producto de la combinación de habilidades de los mismos gérmenes, para favorecer su

permanencia y proliferación en el tracto respiratorio porcino (Iglesias y Trujano, 2000). El complejo respiratorio porcino se encuentra asociado con varios agentes etiológicos dentro de los que se incluyen: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, los virus de influenza porcina, coronavirus, fiebre porcina clásica, enfermedad de Aujeszky, virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRS) y PCV-2 (Harms *et al.*, 2002; Opriessnig *et al.*, 2004). Los agentes infecciosos primarios pueden ser virus o bacterias; los cuales, inician la infección en el cerdo en las vías respiratorias superiores, principalmente por la ruta oronasal, a través del epitelio nasal, tonsilar y macrófagos pulmonares. El agente primario penetra a través de las mucosas y se multiplica en los macrófagos circulantes y también puede replicarse en el tejido linfoide. Estos agentes infecciosos producen el daño de los epitelios presentes en la mucosa oral, en la mucosa de la tráquea y en el epitelio alveolar (Gilbert, 1997). Además provocan la pérdida de los cilios que se encuentran en la mucosa respiratoria, favoreciendo tanto el establecimiento de infecciones primarias, como el establecimiento de infecciones oportunistas (Silin *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2003). Las enfermedades respiratorias de origen bacteriano causadas por *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y *Haemophilus parasuis* son de una importancia mayor en la industria porcícola. Estudios realizados, reportan pérdidas económicas, asociadas con el aumento de conversión alimenticia, disminución en la ganancia diaria de peso (Rayamajhi *et al.*, 2005; Koyama *et al.*, 2007; Buettner *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008), y aumento en la extensión de lesiones pulmonares (Torres *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000), aunado a el incremento en la mortalidad (Álvarez *et al.*, 2004). Actualmente la productividad en piaras infectadas, es mejorada por el tratamiento antibiótico y por los programas de vacunación (Buettner *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Hoeltig *et al.*, 2009).

La permanencia de los patógenos bacterianos en el tracto respiratorio de los portadores clínicamente sanos, es de gran importancia en la manera en que se propaga la infección en animales y humanos (Kramer *et al.*, 2006; Buettner *et al.*, 2008). Un alto número de patógenos bacterianos se presentan como comensales de la flora en el tracto respiratorio alto del cerdo y en ocasiones éstos microorganismos pueden causar enfermedades en el animal o infectar a otros predispuestos por sus variantes en su salud y edad (MacInnes *et al.*, 2008). Sin embargo, *A. pleuropneumoniae* no es un habitante normal del aparato respiratorio del cerdo, su presencia en tejidos es capaz de causar enfermedad clínica e infecciones fatales. El microorganismo se encuentra presente en tejidos de animales enfermos o en cerdos que se recuperan de la infección (Hernández *et al.*, 2002). Se ha demostrado la presencia de *A. pleuropneumoniae*, en cerdos que actúan como portadores sanos, respaldando el hecho de que la mayoría de las piaras a nivel mundial están endémicamente infectadas con *A. pleuropneumoniae* y sólo una pequeña proporción de granjas presenta cerdos con la enfermedad clínica (Fenwick y Henry, 1994).

### **2.3. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App)**

#### **2.3.1. Antecedentes**

*Actinobacillus pleuropneumoniae* es el agente etiológico de la Pleuroneumonía Porcina (P.P) (Liu *et al.*, 2009), su propagación es altamente contagiosa y frecuentemente con resultados fatales para los cerdos, por consiguiente ocasiona grandes pérdidas económicas en la producción industrializada del cerdo a nivel mundial (Benga *et al.*, 2009); Reportándose morbilidad (100%) y mortalidad alta (20-80%), los animales que sobreviven a la infección inicial, frecuentemente se vuelven animales débiles, de lento crecimiento y tienen lesiones crónicas en pulmón (Gottschalk y Taylor, 2006; Benga *et al.*, 2009), obteniendo como resultado

una pobre conversión alimenticia, ocasionando un fuerte gasto en medicación y vacunación. (Buettner *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Hoeltig *et al.*, 2009). Sólo los cerdos son susceptibles a *App*; hasta la fecha no ha sido aislada de roedores, seres humanos, aves, y no persiste en el medio ambiente. Sin embargo, se puede producir la enfermedad en ratones al inocular grandes cantidades de bacterias, por vías intraperitoneal o intranasal (Enríquez *et al.*, 2003).

### **2.3.2. Características**

Es un cocobacilo gramnegativo de la familia de las pasteurelanceas (Jacques *et al.*, 2005; Rayamajhi *et al.*, 2005; Hedegaard *et al.*, 2007; Tegetmeyer *et al.*, 2008); pleomórfico, anaerobio facultativo, no esporulado y capsular, sin motilidad aunque en un trabajo reciente se describieron flagelos y movilidad. Bioquímicamente, es ureasa positiva, capaz de fermentar manitol, xilosa y ribosa y fermentación variable de lactosa. En medio artificial ocurre la transformación morfológica de colonia rugosa a lisa. Las colonias en placas de agar sangre exhiben 13 hemólisis y han sido identificadas fimbrias por tinción negativa.

**2.3.2.1. Generalidades.** Es una bacteria cuya característica principal es depender del dinucleótido de nicotina y adenina (NAD) en los aislamientos (Williams, 2002). Este factor debe ser proporcionado in situ mediante una estría de cepas nodrizas; para tal fin, se utilizan bacterias del género *Staphylococcus*. El aislamiento inicial de *App* es con atmósfera de CO del 5-7%. Esta bacteria es positiva a la reacción de CAMP (Prueba de Christie Atkins-Munch Petersen), que consiste en una reacción de complementación entre una cohemolisina de *App* con una esfingomielisina de *Staphylococcus aureus*. Puede ser clasificada en dos biotipos según sus requerimientos de dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD). El biotipo 1 es dependiente de este nucleótido, mientras que el biotipo 2, es generalmente independiente

(MacLean *et al.*, 2004; Rayamajhi *et al.*, 2005; Schuchert *et al.*, 2004). En el biotipo 1, se han reconocido 12 serotipos; en el biotipo 2 se reconocen los serotipos 13 y 14. Recientes estudios muestran la identificación del serotipo 15 que se agrupa dentro del biotipo 1 ya que es dependiente de NAD. (Rayamajhi *et al.*, 2005; Gottschalk y Taylor, 2006; Koyama *et al.*, 2007).

*A. pleuropneumoniae* también es capaz de adherirse a las células bucales epiteliales lo cual puede ser un factor importante en la existencia de cerdos portadores sanos (Hamer *et al.*, 2004).

**2.3.2.2. Adhesión.** Se define a la adhesión bacteriana como la asociación específica y relativamente estable entre la célula bacteriana y una superficie, la que puede ser otra célula o productos celulares. En este fenómeno participan principalmente dos moléculas: se denomina adhesina a la molécula o estructura de la superficie que participa en el proceso por parte de la bacteria y receptor a la parte complementaria en el hospedero o en el ambiente. La adhesión es indispensable para la bacteria como un paso inicial para un proceso de colonización, tanto para las bacterias de la flora normal como para las bacterias patógenas, las que originan un proceso infeccioso y en consecuencia una enfermedad. Para muchas bacterias la adhesión es también importante para su mantenimiento en los tractos o tejidos, ya que su capacidad de anclaje evita su eliminación por los mecanismos propios del huésped, entre éstos se encuentran la acción de limpieza de fluidos biológicos tales como el moco entérico, la sangre, la orina, así como el transporte mucociliar, e incluso la microflora normal previamente establecida. Los receptores de células animales se encuentran formando parte de la membrana o de su superficie externa, como las glicoproteínas receptoras llamadas integrinas. Otras proteínas receptoras son las de matriz extracelular (MEC) y las presentes en el plasma. Se ha demostrado que la adherencia al

colágeno porcino es más evidente en los serotipos 1 y 7 (Enríquez *et al.*, 2004).

**2.3.2.3. Epidemiología.** La transmisión de la enfermedad de cerdos portadores sanos o portadores crónicos juega un papel crucial en la epidemiología de la enfermedad y representan la principal fuente de infección de cerdos susceptibles (Kramer *et al.*, 2006; Buettner *et al.*, 2008). *Gottschalk y Taylor (2006)*, reportan su dispersión por contacto directo o a través de aerosoles. El modo de transmisión aéreo no parece ser una manera común de contagio. Desrosier *et al.*, (1984) no fue capaz de demostrar la transmisión de la infección por vía aérea durante un periodo de 2 meses en un ensayo en donde cerdos susceptibles fueron mantenidos separados de animales infectados en forma aguda y mantenidos a 3 metros de distancia de los enfermos. Torremorell *et al.*, (1997) demostró que la transmisión aérea era posible a un metro de distancia. Sin embargo Kristensen *et al.*, (2004) no fue capaz de demostrar la transmisión a esa distancia, cuando menos del 10 % del aire, era transferido de un área contaminada a un área libre del patógeno, simulando lo que normalmente ocurre bajo condiciones naturales.

**2.3.2.4. Patogénesis y Factores de virulencia.** Éste patógeno, coloniza el tracto respiratorio en el huésped y persiste en las tonsilas (sitio primario de colonización) según *Gottschalk y Taylor (2006)*, además del epitelio sano de los pulmones y lesiones adyacentes (Buettner *et al.*, 2008), causando la enfermedad de tipo aguda o de tipo crónica (Morilla *et al.*, 2004).

Cuando persiste en pulmones necróticos, tonsilas y en cavidad nasal llega a provocar la enfermedad crónica (Jacobsen *et al.*, 2005). El tipo crónico suele ser muy contagioso, debido a su persistencia en el cerdo y generalmente resulta en la muerte del animal (Sheehan *et al.*, 2003; Wagner y Mulks, 2007).

Las lesiones en el tejido respiratorio son dadas tanto por las toxinas Apx y otros compuestos (polisacáridos capsulares, proteasas y lipopolisacáridos) (Bandara *et al.*, 2003; Hamer *et al.*, 2004; Rayamajhi *et al.*, 2005).

**Cápsula.** Es la responsable de la especificidad del serotipo de *App* y se reconocen 12 serotipos del biotipo 1 debido a la presencia del antígeno capsular. Los fosfatos y el ácido carboxílico le confieren una carga negativa. Las propiedades biológicas de la capsula son: no tiene actividad tóxica, es inerte, no tiene actividad pirogénica, debido a la carga negativa hay resistencia a la fagocitosis por neutrófilos, es opsonizada por anticuerpos, e interfiere con la actividad del complemento. Los anticuerpos generados contra la capsula protegen contra la muerte, pero no contra la enfermedad o contra la infección crónica. La virulencia atribuida a la capsula es variable entre los diferentes serotipos, pero se requiere la capsula para que la bacteria sea virulenta.

**Lipopolisacárido (LPS).** El antígeno serotipo específico de *App* son los lipopolisacáridos de la membrana. El LPS es similar al encontrado en otras bacterias gramnegativas. La cadena O específica, le confiere las características fenotípicas de cepas lisas, semirrugosas y rugosas. El antígeno O es el responsable de las reacciones cruzadas entre los serotipos 3, 6, y 8; y 1, 9, y 11 (Williams, 2002). Las propiedades biológicas del LPS son: tiene actividad de endotoxina, gelifica a los amebocitos del género *Limulus*, produce reacción de Schwartzman, actúa como un pirógeno, induce la liberación de mediadores proinflamatorios y estos mediadores activan varias células, como macrófagos y neutrófilos y juega un papel importante en la inflamación aguda. La administración de LPS de *A. pleuropneumoniae* a cerdos induce neumonía no necrosante con infiltración de neutrófilos.

**Exotoxinas.** Las exotoxinas bacterianas son proteínas extracelulares solubles, que al ser liberadas al medio por el organismo vivo, se activan bioquímicamente. Se han identificado cuatro tipos de citotoxinas en *App*, las cuales son llamadas toxinas Apx, que pertenecen a la familia de las toxinas RTX formadoras de poros (Enríquez *et al.*, 2003; Rayamajhi *et al.*, 2005). La mayoría de los serotipos traen consigo ya sea Apx I y Apx II, o el Apx II y Apx III, además todos los serotipos traen el Apx IV (Gottschalk y Taylor, 2006). Las toxinas Apx son el principal factor de virulencia y en su ausencia la cepa de *App* es avirulenta (Enríquez *et al.*, 2003), son altamente inmunogénicas, por lo tanto inducen una respuesta fuerte de anticuerpos en animales infectados con *A. pleuropneumoniae*. Apx I, Apx II y Apx III, son también secretadas por otras especies de *Actinobacillus* tales como *A. rossii*, *A. suis*, y reportado como no patogénico *A. porcitonisillarum*, que puede inducir anticuerpos contra éstas toxinas en cerdos (Schaller *et al.*, 2000; Gottschalk *et al.*, 2003; Rayamajhi *et al.*, 2005).

**Apx I:** Proteína de 105 kDa, fuertemente hemolítica y fuertemente citotóxica. Es codificada por el operón *apxI*, que tiene 4 genes: *apxIC* (activador), *apxIA* (pretoxina) *yapxIB* y *apxID* (aparato de secreción). La proteína ApxI la producen los serotipos 1, 5a, 5b, 9, 10 y 11 y por lo tanto son los más virulentos.

**Apx II:** Proteína de 103-105 kDa, débilmente hemolítica y moderadamente citotóxica, es codificada por el operón *apxII* y consiste de 2 genes: *apxIIC* y *apxIIA*, utiliza los productos de los genes *apxIB* y *apxID* para secretarse, la producen todos los serotipos excepto el 10. Se ha reportado que los serotipos que tienen el Apx I y Apx II (Serotipos 1,5,9 y 11) son más virulentos que los otros serotipos (Gottschalk y Taylor, 2006). Bei *et al.*,(2005) desarrollaron una mutante avirulenta de *A. pleuropneumoniae*

serotipo 7 que expresaba la toxina Apx II inactivada. Dicha mutante produjo 100 % de inmunidad protectora contra el desafío homólogo con el serotipo 7 y protección parcial (70 %) contra el desafío heterólogo con cepas de serotipo 1 y 3. Mutantes de *A. pleuropneumoniae* que carecen de Apx I y de Apx II fueron incapaces de inducir las lesiones características de la enfermedad, lo que sugiere que ambas toxinas son esenciales en la patogénesis de la pleuroneumonía (Boekema *et al.*, 2004).

**Apx III:** Proteína de 120 kDa, es no hemolítica y fuertemente citotóxica, codificada por el operón *apxIII* y contiene 4 genes: *apxIIIC*, *apxIIIA*, *apxIIIB* y *apxIIID*. Apx III la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8.

**Apx IV:** Proteína de 202 kDa, con actividad hemolítica débil; es específico para el *A. pleuropneumoniae*, y ésta expresado en todos los serotipos (Rayamajhi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). Los métodos moleculares como la amplificación de los genes del Apx IV y la secuencia del 16 S ribosomal del ADN han sido reportados como una alternativa confiable del método para clasificar *A. pleuropneumoniae* (Jessing *et al.*, 2003; Sthitmatee, 2003; da Costa *et al.*, 2004); tienen actividad citotóxica y la producen todos los serotipos, además de que son específicas del serotipo (Cho y Chae, 2001; Enríquez *et al.*, 2003). La actividad hemolítica de estas proteínas es probablemente la responsable de las lesiones iniciales de la PP, caracterizadas por ser hemorrágicas y necrosantes.

**Proteasas.** Las proteasas de microorganismos son factores de virulencia, ya que hidrolizan componentes proteicos del huésped y facilitan su invasión. *App* secreta enzimas proteolíticas hacia el medio de cultivo y éstas tienen actividad sobre varios sustratos como son la gelatina, hemoglobina 19A porcina; Las proteasas son probablemente inactivas cuando están dentro de la célula y se activan cuando se secretan,

deduciéndose que podría facilitar la invasión de la bacteria a las mucosas del tracto respiratorio del cerdo. Las proteasas de esta bacteria patógena son metaloproteasas neutras y se proponen como un factor de virulencia, ya que pueden facilitar la colonización de este microorganismo. Una proteasa de alto peso molecular fue purificada de sobrenadantes de cultivo y caracterizada bioquímicamente. Anticuerpos contra esta proteasa reconocen a todos los serotipos de *App*. (Enríquez *et al.*, 2003).

**Proteínas de membrana externa (PME).** Se han identificado varias PME en *App* y todos los serotipos contienen varias proteínas comunes, incluyendo una lipoproteína asociada al peptidoglicano llamada PalA, una proteína modificable por calor, además de una de 48 kDa que no está presente en otras especies gram-negativas, relacionada con la patogénesis del tracto respiratorio del cerdo. Las PME son importantes en la regulación de proteínas de superficie en respuesta a las condiciones de crecimiento en el medio ambiente y se ha determinado su participación como receptores para elementos indispensables para su crecimiento, además de que estas proteínas son capaces de inducir cierta respuesta inmune. Archambault *et al.*, (2003) demostraron la existencia de proteínas de membrana que se unen a la Hemoglobina del cerdo lo cual sugiere que podrían ser un mecanismo de captura de hierro para la supervivencia de la bacteria in vivo; la lactoferrina, la transferrina y la hemoglobina son moléculas con alta afinidad por el hierro que reducen la disponibilidad de este mineral para patógenos potenciales. La capacidad para captar hierro de estas moléculas ha sido demostrada en las cepas patógenas de *A. pleuropneumoniae* a través de ciertas proteínas de membrana que son expresadas in vivo (Beddek *et al.*, 2004).

**Adhesinas.** Se ha descrito que el LPS es una adhesina importante para el anclaje de la bacteria y se han propuesto algunos receptores posibles. Si bien se ha demostrado la presencia de fimbrias tipo IV que están

localizadas en la superficie de las cepas de *App*, su papel en la adhesión no ha sido establecido, pero se piensa que funcionan en la adhesión a las células del hospedero como sucede en otras bacterias gram-negativas (Enríquez *et al.*, 2003).

**Fimbrias.** La presencia de fimbrias también debe jugar un papel en la adherencia de la bacteria las superficies mucosas; poseen una proteína de 17-kd, que reacciona en forma cruzada con la fimbria tipo IV de *M. bovis*. La regulación genética asociada con la expresión de las fimbrias ha sido evaluada (Boekema *et al.*, 2004). La expresión de dichos genes ha sido demostrada después que la bacteria entra en contacto con células epiteliales *in vivo* después de la inoculación experimental por vía endobronquial.

**2.3.2.5. Signos clínicos.** Los signos clínicos varían con el estado inmune de los animales, las condiciones ambientales, el grado de exposición al agente infeccioso y la cepa de la que se trate (Maes *et al.*, 2001). La enfermedad puede presentarse en cerdos de todas las edades, pero son los animales en crecimiento y cebo, entre los 2 y 6 meses de edad, los habitantes afectados de forma más aguda. En la forma hiperaguda, uno a mas cerdos del mismo corral o de diferentes mueren súbitamente con fiebre de 41.5°C, apatía y anorexia. Existe un periodo corto de una ligera diarrea y vómito. Los cerdos afectados mueren en el piso sin mostrar signos respiratorios. En la forma aguda, los cerdos manifiestan un incremento en la temperatura corporal entre 40.5 y 41°C, los animales se encuentran deprimidos y no comen. Se presentan varios signos respiratorios como son: disnea, tos, y algunas veces respiran por la boca. La forma crónica se desarrolla después de desaparecer los signos agudos. Puede haber o no fiebre y se presenta tos espontánea o intermitente con grado variable de intensidad. Los animales muestran pérdida de apetito y consecuentemente se presenta un decremento en la ganancia de peso corporal. En piaras

infectadas crónicamente existen muchos animales enfermos subclínicamente. Los signos clínicos pueden estar exacerbados por otras infecciones respiratorias (Williams, 2002).

Es común que la infección por *A. pleuropneumoniae* se convierta en endémica en determinadas explotaciones, especialmente en las de ciclo continuo. En estas explotaciones, las madres transmiten el patógeno a su progenie y al mismo tiempo, los anticuerpos maternos. Se crea así un estado de equilibrio que evita la infección generalizada hasta que el título de anticuerpos maternos en las crías cae por debajo del límite protector. En este momento el patógeno coloniza las vías respiratorias inferiores y se genera una nueva situación que en función de una serie de factores, conduce a la infección aguda o la crónica (Chiers *et al.*, 2002).

**2.3.2.6. Lesiones.** Las lesiones macroscópicas están localizadas en el tracto respiratorio. La neumonía es en su mayoría bilateral y se afectan los lóbulos cardíaco y apical, así como una parte de los lóbulos diafragmáticos donde las lesiones neumónicas son frecuentes, localizadas, y bien demarcadas. Las áreas neumónicas son oscuras y sólidas. La cavidad torácica contiene líquido sanguinolento. En muchos casos crónicos, nódulos de diferentes tamaños se desarrollan principalmente en los lóbulos diafragmáticos. Esos nódulos similares a abscesos, están delimitados por una delgada capa de tejido conectivo y se observa algunas áreas de adherencia de la pleura. En algunos casos, las lesiones de los pulmones sanan y solamente se puede observar residuos localizados de la adherencia pleural (Williams, 2002). En los estadios tempranos de la enfermedad, los cambios histopatológicos están caracterizados por necrosis, hemorragia, infiltración por neutrófilos, activación de plaquetas y macrófagos, trombosis vascular, edema, y exudado fibrinoso (Chiers, 1999; Williams, 2002).

**2.3.2.7. Diagnóstico.** Para poder determinar la presencia de patógenos microbianos se pueden emplear técnicas de aislamiento de microbiología clásica o bien técnicas de biología molecular (Sixou, 2003). El uso de pruebas serológicas es fundamental para la identificación de portadores asintomáticos, responsables de la diseminación de la enfermedad en piaras no infectadas. Las técnicas inmunológicas directas como inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (IHQ) representan otra opción para el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina. Estas técnicas tienen como base la identificación de antígenos, serotipo y biotipo específicos en tejidos frescos, congelados o fijados en formol e incluidos en bloques de parafina (Takashima *et al.*, 1999).

**Aislamiento bacteriano.** Se toma una muestra de tejido normal o con lesiones neumónicas. Las muestras son inoculadas en agar sangre con una estría de *Staphylococcus aureus* para proveer el factor V. Las placas son incubadas durante 24 h a 37°C bajo condiciones de microaerobiosis. Las colonias sospechosas son transferidas a cajas con agar tripticasa soya (TSA) suplementado con 10 µg/ml de NAD y 1% de suero fetal bovino que posteriormente son incubadas durante 24 h a 37°C bajo condiciones de microaerobiosis. La identificación final de las colonias sospechosas a *A. pleuropneumoniae* se obtiene mediante el uso de pruebas bacteriológicas de rutina como tinción de Gram, oxidasa, catalasa, ureasa de Christensen, reacción a la prueba de CAMP, satelitismo en presencia de la cepa nodriza de *S. aureus* y dependencia de factores de crecimiento utilizando discos impregnados con factor X, V o X+V. (Blackall *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2002). A partir de muestras de pulmones de rastro es difícil, en comparación con aislamientos obtenidos de lesiones hiperagudas y agudas, y a que el crecimiento de la bacteria en lesiones crónicas es irregular, aún cuando se le proporcionen las condiciones necesarias para su crecimiento. La dificultad de aislar *A. pleuropneumoniae* de lesiones crónicas, se relaciona con la

presencia de otras bacterias en pulmones, las cuales pueden inhibir el crecimiento del *A. pleuropneumoniae* (Williams *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2002).

**Histopatología.** Las muestras de pulmón para histopatología son fijadas en formalina amortiguada (pH 7.2) al 10% y procesadas con la técnica de inclusión en parafina. Se cortan secciones de 5 cm y se tiñen con hematoxilina y eosina (HE).

**Inmunohistoquímica.** Los antígenos bacterianos son detectados por el método de avidina-biotina-peroxidasa; Se han utilizado anticuerpos policlonales producidos por conejos en el laboratorio contra células completas de *A. pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1, como anticuerpo primario a una dilución de 1:1 500 y como anticuerpo secundario, una anti-IgG de conejo biotinilada. Los antígenos o restos antigénicos de *A. pleuropneumoniae* son identificados de color café oscuro, utilizando el cromógeno diaminobencidina (DAB) (Bosse *et al.*, 2002). Posteriormente, las muestras son teñidas con hematoxilina de Harris como colorante de contraste. Se usan secciones de tejido pulmonar de cerdos inoculados experimentalmente con *A. pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1, y de cerdos sanos libres de *A. pleuropneumoniae* como testigos positivo y negativo, respectivamente (Takashima *et al.*, 1999, Hernández *et al.*, 2002). Para evaluar la especificidad del antisuero se confrontan los frotis bacterianos de *Pasteurella multocida* serotipos A y D, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* y *A. pleuropneumoniae* serotipos 1, 5, 9 y 11 con el anticuerpo policlonal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

**ELISA.** ELISA indirecta, permite la detección de anticuerpos dirigidos contra la Apx IV de *A. pleuropneumoniae*. Dicha técnica demostró poseer 100 % de especificidad y 93.8 % de sensibilidad pudiendo identificar piaras positivas a la bacteria aun en ausencia de signos clínicos. Cerdos vacunados

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con una vacuna de subunidades conteniendo las toxinas Apx I, Apx II y Apx III resultan negativos a esta técnica de ELISA (Dreyfus *et al.*, 2004).

ELISAs desarrollados para la detección de antígenos de LPS han demostrado ser específicos y útiles para el diagnóstico serológico de la enfermedad (Klausen *et al.*, 2001). Pruebas basadas en la detección del antígeno O-LPS han sido descritas, sin embargo recientemente se demostró la existencia de cepas con LPS incompleto o truncado las cuales no pueden ser detectadas mediante esta técnica.

Recientemente fue demostrado que la citolisina Apx III del serotipo 15 no era detectada por las técnicas serológicas que evidencian Apx III de los otros serotipos, de igual manera vacunas que contienen la citolisina Apx III no protegen contra dicho serotipo lo cual sugiere que posee factores de virulencia diferentes o que la citolisina Apx III posee diferencias significativas con la expresada por otros serotipos (Tumamao *et al.*, 2004)

Títulos altos de anticuerpos contra ApxI, ApxII y contra antígenos capsulares son detectados en cerdos que presentan lesiones pulmonares. Cerdos que albergan *A. pleuropneumoniae* en el tracto respiratorio superior, no muestran niveles de anticuerpos en el suero.

Por lo anterior son necesarios métodos más sensibles para la detección e identificación del agente (*App*) tales como PCR diagnosticando cerdos portadores, ya que las pruebas serológicas no son útiles para ese fin; el uso de hisopados tonsilares puede ser de utilidad (Fittipaldi *et al.*, 2003).

## 2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Un método similar al inmunológico, aunque basado en la detección del material genético de las bacterias, es el uso de técnicas como el PCR ésta técnica detecta la presencia de cantidades muy bajas del patógeno (Torremorell *et al.*, 2006). Las primeras técnicas genéticas utilizadas en el diagnóstico microbiológico se basaban en hibridación con sondas de ADN. Aunque son de elevada especificidad, en general su sensibilidad no es adecuada. (Codina y Tórtola, 2006). Actualmente, la estrategia más utilizada para aumentar la sensibilidad se basa en crear múltiples copias de un fragmento del genoma; es la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utiliza para microorganismos de lento crecimiento o de difícil aislamiento y para aquellos procesos que por su gravedad puedan beneficiarse especialmente de un diagnóstico rápido. (Sixou, 2003; Codina y Tórtola, 2006). Casi cualquier tipo de muestra puede ser utilizada para la realización de esta técnica, la cual detecta el material genético del patógeno en cuestión; estando vivo o inactivado el microorganismo, lo que nos da una elevada sensibilidad; por ello se puede utilizar sangre, suero, semen o tejidos.

Esta nueva técnica de diagnóstico molecular, cumple en gran medida con los parámetros ideales de las pruebas diagnósticas: rapidez, especificidad y sensibilidad, es catalogada dentro de la nueva era del diagnóstico, debido a que su alta sensibilidad (Liu *et al.*, 2007), puede detectar hasta 100 TCDI50 (Dosis Infectantes en Cultivo de Tejidos=TCDI) de organismos por muestra, es decir, en términos prácticos puede llegar a detectar el material genético de solo 10 partículas virales presentes en 1 ml de muestra y tiene una alta especificidad y rapidez. Estudios en humanos han reportado que presenta una sensibilidad de un 80.3% y una especificidad de 97.8%. (Altchech *et al.*, 1993).

En algunos estudios, se ha demostrado que la técnica de PCR para la detección de *A. pleuropneumoniae* desarrollada en base a la amplificación del gen dsbE-like, es de utilidad para la detección de cerdos portadores de la bacteria a partir de hisopados nasales (Chiers *et al.*, 2001); otra prueba de PCR serotipo específica demostró que diferentes serotipos pueden colonizar las amígdalas de un mismo animal (Schuchert *et al.*, 2004).

A pesar de que existen varios tipos de diagnóstico para las enfermedades infecciosas producidas por bacterias, para dicho estudio se emplea el diagnóstico por PCR usando oligonucleótidos específicos para cada patógeno bajo estudio.

#### **2.4.1. Proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una prueba que se utiliza para amplificar una porción específica del material genético del microorganismo (ácido nucleico).

Se extrae el ácido nucleico específico de la muestra (tejido) y se elimina el exceso de proteínas y de sustancias inhibitorias.

El ácido desoxirribonucleico o ADN es la muestra para iniciar el PCR, por ello las bacterias y virus ADN pueden ser utilizados directamente para la prueba. En el caso del material genético conformado por ARN, se debe de convertir de ARN en ADN, utilizando una enzima conocida como retrotranscriptasa o transcriptasa inversa, con ello se crea un ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario), para poder utilizar así una secuencia blanco adecuada para la prueba (Extracción y purificación de ADN).

## 2.4.2. Etapas básicas en la amplificación de PCR

1. Desnaturalización: esta se produce cuando el ADN es calentado aproximadamente a 90°C, lo que causa que se dé una separación de la doble hélice del ADN, creando dos bandas sencillas de ADN.

2. Alineación: La temperatura se reduce alrededor de los 50°C; permitiendo que los iniciadores o primers diseñados, que son secuencias del material genético blanco, diseñadas para acoplarse, se unan a una región específica del ácido nucleico de banda sencilla que queremos identificar (esta unión es la que da una alta especificidad a la prueba). Normalmente tienen 20 bases o nucleótidos de longitud.

3. Elongación o prolongación: En esta fase la secuencia blanco y los iniciadores en conjunto con nucleótidos libres (dNTP'S) y la *Taq* polimerasa son calentados aproximadamente a 70°C. Con ello los nucleótidos libres se acoplan a la secuencia específica que marca el iniciador y son pegados por acción de la *Taq* polimerasa, para formar así una molécula de ADN de dos bandas.

Los tres pasos anteriores corresponden a lo que se le llama un ciclo de amplificación. Estas tres fases son repetidas, una y otra vez en un termociclador, para amplificar el ADN. Después de 35 ciclos (2 a 3 horas), la banda inicial de ADN se ha amplificado exponencialmente, produciendo así 235 (34'359'738,368) moléculas idénticas (producto del PCR) del ADN original a partir de una sola molécula de ADN. Esta amplificación exponencial es la que da la sensibilidad a la prueba.

Posteriormente, para valorar el producto del PCR es necesario realizar la prueba de electroforesis en un gel de agarosa; con el objeto de realizar un

acomodo por tamaño de los fragmentos de ADN amplificados en el PCR. Con una corriente eléctrica que es transmitida a través del gel de agarosa, se logra este acomodo en donde los fragmentos de menor tamaño se distribuyen más rápido que los de mayor tamaño.

En el gel de agarosa existen diferentes “carriles” de corrimiento. En forma normal se utiliza uno de estos carriles de los extremos para colocar un control o marcador de pares de bases conocido, normalmente de 0 a 600 pares de bases (bp), con incrementos de 100 bp, seguido se coloca un control positivo y negativo, ambos productos del PCR y en los carriles restantes se coloca el producto del PCR obtenido de las muestras problema. Al aplicar la corriente eléctrica los fragmentos de ADN tienden a migrar. Posteriormente el gel es teñido con bromuro de etidio (o algún colorante fluorescente) que solo se adhiere al ADN presente en la agarosa del gel. El gel es visualizado con una lámpara de luz ultravioleta y se escanea o se fotografía para dejar una evidencia física del corrimiento electroforético. Con la fotografía o imagen escaneada del gel se determina el tamaño de los fragmentos amplificados del producto del PCR, comparándolo contra el control de pares de bases y el control positivo (Lara *et al.*, 2006).

#### **2.4.3. Ventajas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Durante los últimos años ha habido un aumento en las técnicas de diagnóstico basadas en el uso de PCR, ésta prueba tiene la capacidad de amplificar rápidamente una cadena de ADN, además de ser una técnica muy sensible y específica, la región que se está amplificando ofrece ventajas sobre las técnicas de diagnóstico tradicionales puesto que el microorganismo que se detecta no necesita ser cultivado previamente o estar vivo, debido a que solamente se requiere la presencia de ADN. (Torremorell *et al.*, 2006). En un estudio realizado por Pijoan y Ruiz (2001), señalan que en animales

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

muestreados con la prueba de PCR en brotes de campo, gran proporción puede estar infectada antes de que se observe la diseminación rápida del organismo dentro de granja; de tal manera que con una muestra mínima (10 ng), se puede dar la amplificación del DNA genómico. (Sambrook y Russell, 2001). Esta técnica de diagnóstico más sensible que la serología, ya que se ha demostrado que cerdos vacunados con una vacuna de subunidades conteniendo las toxinas Apx I, Apx II y Apx III resultan negativos a la técnica de ELISA (Dreyfus *et al.*, 2004). En otros estudios, en animales supuestamente negativos a *M. hyopneumoniae*, se obtuvieron resultados positivos con la técnica de PCR (Torremorell *et al.*, 2006); estudios con ELISA indirecta, han empleado anticuerpos dirigidos contra la toxina Apx IV de *A. pleuropneumoniae* y a pesar de que los autores encuentran un 100 % de especificidad y 93.8 % de sensibilidad se pueden identificar rebaños positivos aun en ausencia de signos clínicos, con la desventaja de que esta toxina puede cruzar con especies como *Pasteurella* (Rayamajhi *et al.*, 2005). También se ha reportado que PCR presenta porcentajes mayores de sensibilidad para detección de bacterias en bovinos, Morales *et al.*, (2005) realizó la comparación de sensibilidad de PCR e histopatología y con aislamiento bacteriano, obteniendo una sensibilidad del 82.0% y 72.0% respectivamente.

### 3. HIPOTESIS

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite diagnosticar la presencia *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en muestras de sangre completa obtenidas en granjas porcícolas del estado de Aguascalientes.



#### 4. OBJETIVO GENERAL:

Realizar la detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en muestras de sangre completa de cerdos en granjas porcícolas del estado de Aguascalientes mediante la metodología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa usando oligonucleótidos específicos.



## 5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Utilizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa mediante el uso de oligonucleótidos específicos para *Actinobacillus pleuropneumoniae* en muestras sanguíneas.

Detectar la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en muestras sanguíneas de explotaciones porcícolas del estado de Aguascalientes.

Estimar la frecuencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en muestras sanguíneas de explotaciones porcícolas del estado de Aguascalientes.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio forma parte del proyecto FOMIX-AGS-2005-01-15051 CONCYTEA. Detección y prevención de enfermedades respiratorias del cerdo a través del concepto de Granja Limpia. Junio 2006-Junio 2008.

El enfoque de esta investigación es cuantitativo, con un diseño no experimental, tipo transeccional exploratorio.

### 6.1. Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en 12 granjas porcícolas ubicadas en los municipios de Aguascalientes, Asientos, Jesús María, Pabellón de Arteaga, San Francisco de los Romos y El Llano del Estado de Aguascalientes (Figura 1).

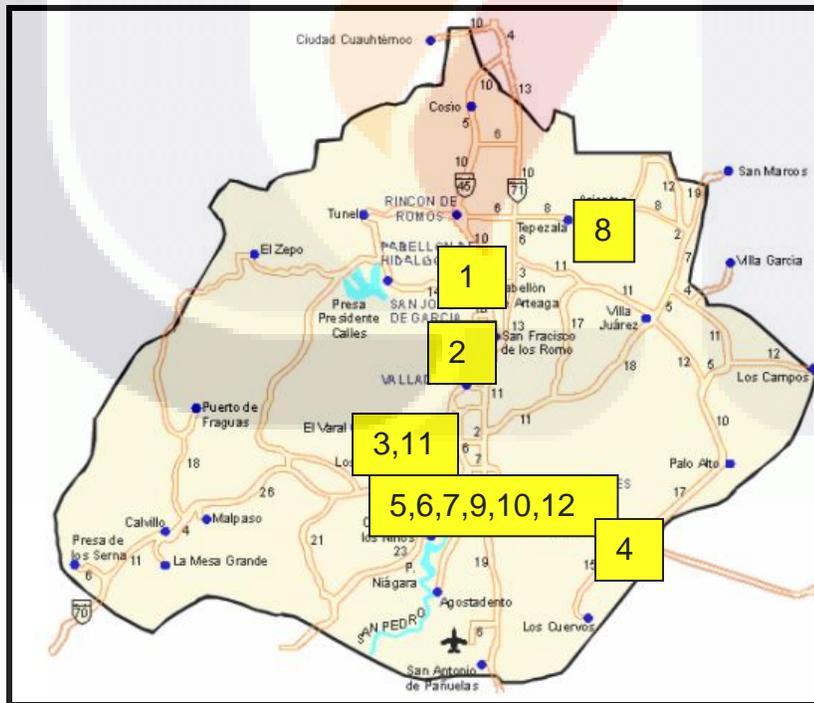


Figura 1. Ubicación de las 12 granjas porcícolas, en los diferentes municipios del Estado de Aguascalientes.

El estado es una entidad federativa de la República Mexicana con una superficie de 5,589 kilómetros cuadrados, que representa el 0.3 por ciento de la superficie del país. Colinda al norte, este y oeste con el Estado de Zacatecas; al sur y este con el de Jalisco. La división política consta de once Municipios: Aguascalientes, Asientos, Calvillo, Cosío, Jesús María, Pabellón de Arteaga, Rincón de Romos, San José de Gracia, Tepezalá, San Francisco de los Romo y El Llano.

Se encuentra en las coordenadas: Norte  $22^{\circ}27'$ , al sur  $21^{\circ}38'$  de latitud norte; Al este  $101^{\circ}53'$ , al oeste  $102^{\circ}52'$  de longitud oeste.

En términos generales, el clima en el estado de Aguascalientes es de carácter semiseco, con una temperatura media anual de  $17.4^{\circ}\text{C}$  y una precipitación pluvial media de 526 mm. El periodo de lluvias corresponde al verano; en las otras estaciones del año las lluvias que se registran son de baja intensidad. Existe una región en el suroeste, enclavada en una gran parte de la Sierra El Laurel, municipio de Calvillo, que presenta un clima templado y que por tener una reducida extensión no es digna de considerarse.

Clima semiseco. Se le denomina también seco estepario, se caracteriza porque en él la evaporación excede a la precipitación, y está asociado principalmente a comunidades vegetativas del tipo de matorral desértico y vegetación xerófila. Se localiza en casi todo el estado cubriendo aproximadamente el 86.30% de la superficie.

La lluvia media anual oscila entre los 500 y los 600 mm y la temperatura media anual es superior a los  $18^{\circ}\text{C}$ .

La máxima ocurrencia de lluvias oscila entre los 110 y 120 mm, registrándose en el mes de junio. La mínima se presenta en el mes de marzo con un rango menor de 5 mm. El régimen térmico más cálido se registra en mayo con una temperatura entre los 22 y los 23°C, siendo el mes más frío enero con una temperatura de 13 a 14°C.

Heladas. En los climas semisecos la frecuencia de heladas es de 10 a 80 días al año, siendo el rango de 20 a 40 días el que se presenta con mayor incidencia dentro de la entidad, y que corresponde al periodo que va de noviembre a febrero.

Granizadas. Aproximadamente un 80% del estado presenta una frecuencia de granizadas en un rango de 0 a 2 días anuales en los climas semiseco y templado. El 18% de la entidad tiene una frecuencia de heladas de 2 a 4 días al año. En el 2% restante el fenómeno es inapreciable. Las granizadas no guardan un patrón de comportamiento bien definido, aunque están asociadas con periodos de precipitación. Su máxima incidencia se presenta en los meses de julio y agosto. (<http://www.aguascalientes.gob.mx>, 2006)

## 6.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS GRANJAS PORCINAS

Cuadro 7. Características de las 12 granjas porcinas que fueron muestreadas.

	<b>Municipio</b>	<b>Sitio</b>	<b>Origen</b>	<b>Número de animales</b>
1	Pabellón de Arteaga	Engorda	Otro	2500
2	San Fco. De los Romo	Completo	Aguascalientes	75
3	Jesús María	Completo	Aguascalientes	740
4	El Llano	Completo	Aguascalientes	564
5	Aguascalientes	Completo	Aguascalientes	300
6	Aguascalientes	Completo	Aguascalientes	600
7	Aguascalientes	Completo	Aguascalientes	800
8	Asientos	Completo	Aguascalientes	800
9	Aguascalientes	Completo	Aguascalientes	280
10	Aguascalientes	Completo	Aguascalientes	800
11	Jesús María	Completo	Aguascalientes	260
12	Aguascalientes	Completo	Aguascalientes	60

## 6.3. Cerdos del estudio

Se escogieron 15 cerdos por granja para la obtención de muestras; estos cerdos variaron en peso, edad, raza, estado de salud; debido al tipo de muestreo que se realizó.

#### **6.4. Tamaño de la muestra**

El número de animales de los que se tomaron muestras de sangre, así como las granjas participantes en el estudio, fueron determinados en conjunto con la Asociación Ganadera Local de Porcicultores de Aguascalientes en base a un muestreo por aleatorio cuotas (Hernández *et al.*, 2006). Durante un periodo de año y medio se tomaron 15 muestras de sangre completa de cerdo por granja.

#### **6.5. Obtención y preservación de muestras**

Las muestras de sangre completa, se obtuvieron de la vena cava anterior por venopunción utilizando vacutainers con EDTA, de 7 ml y agujas número 21.5 (Álvarez *et al.*, 2004); se identificaron con nombre de la granja, número progresivo por animal, y fecha de la obtención de muestra; las muestras se trasladaron con refrigerantes y se mantuvieron a 4°C.

#### **6.6. Técnica para PCR**

La técnica del PCR anidado se utilizó para determinar la presencia de, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, presente en 12 explotaciones porcícolas; distribuidas en el Estado de Aguascalientes. Se contó con equipo Termociclador Techne TC-412, un sistema de electroforesis horizontal In Vitro Gene, fuente de poder para electroforesis CONSORT 1200V-500mA E815, un analizador de imágenes ChemiDoc BIO RAD que tiene un programa, Quantity One 4.4 Basic.

### 6.6.1. Extracción del ADN

La obtención del ADN de sangre completa se realizó según la técnica de Leal *et al.*, 1995 modificada. Cada muestra de 300  $\mu$ l de sangre se lisó con 1 ml de solución estabilizadora (SE) para lisis de glóbulos rojos (155 mM NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM NaHCO<sub>3</sub>; 100 mM EDTA disódico, pH 7.4), a 37°C, 10 min., luego se centrifugó a 20 800 x g. El proceso se repitió hasta que el sedimento quedó claro.

La digestión celular se realizó con 300  $\mu$ l de SE para lisis celular (0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 0,3 M NaCl - 0,025 mM EDTA) y 5  $\mu$ l de proteinasa K, a 37°C, 1 hora. La precipitación proteica se hizo con 200  $\mu$ l de 7,5 M de acetato de amonio y centrifugación a 20.800 xg a 4 °C por 3 min. El ADN contenido en el sobrenadante se precipitó con 300  $\mu$ l de alcohol isopropílico y se lavó con 300  $\mu$ l de alcohol etílico 75% a -20 °C. El ADN seco se resuspendió en 100  $\mu$ l de solución de Hidratación de DNA (Amersham). Una vez extraídas las muestras de ADN fueron refrigeradas a 4° C hasta su uso.

Se corrió un gel de electroforesis de agarosa al 1%, para revisar la integridad de ADN. Además se leyeron las muestras en un espectrofotómetro (Jenway 6305) a una longitud de onda de 260 nm, para conocer la concentración de ADN.

### 6.6.2. Preparación del PCR anidado y Amplificación

Series de Oligonucleótidos fueron sintetizados para amplificar; posteriormente se corrió el PCR anidado (Kobish y Frey, 2003). Se realizó una mezcla bajo condiciones de esterilidad para el PCR (volumen total de mezcla 25  $\mu$ l), 2.5  $\mu$ l de 10X taqbuffer, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de cada dNTP, 2.0  $\mu$ l de cada (25 mM) oligonucléotido usado, 2  $\mu$ l (200ng) de ADN problema y finalmente 0.125  $\mu$ l (.625 u) *Taq* polimerasa (Fermentas Lab). Se

utilizó un termociclador Techne TC- 412 a las condiciones descritas en el cuadro 9.

CUADRO 9: Secuencia de los oligonucleótidos usados en el PCR realizado para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Frey, 2003b; Kobish y Frey, 2003).

APXIV	F	TGGCACTGACGGTGATGAT	441
	R	GGCCATCGACTCAACCAT	
A-1	Condiciones	95 °C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C para la desnaturalización, alineación a 30 s a 54 °C y 1.5 minutos a 72 °C para la extensión.	
APXIV	F	GGGGACGTAACCTCGGTGATT	377
	R	GCTCACCAACGTTTGCTCAT	
AN-1	Condiciones	95 °C seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C para la desnaturalización, alineación a 30 s a 54 °C y 1.5 minutos a 72 °C para la extensión.	

F: forward; R: reverse; Pb: Pares de bases (tamaño molecular)

El revelado del PCR fue mediante geles de agarosa (1.5 %) en un sistema de electroforesis horizontal (In Vitro Gene), teñidos con bromuro de etidio (Sambrook y Russell, 2001). Las bandas de ADN amplificado fueron observadas bajo luz UV y capturadas con el sistema analizador de imágenes ChemiDoc. BIO RAD, empleando el programa Quantity One 4.4 Basic. (Frey, 2003<sup>a</sup>; Sambrook y Russell, 2001).

### 6.6.3. Análisis de resultados

Dadas las características del estudio, las variables de respuesta fueron catalogadas como datos discretos, por lo que los datos obtenidos fueron analizados a través de análisis de distribución de frecuencias (Hernández *et al.*, 2006). Para ello se utilizó el software STATISTICA® Ver. 6.2.

## 7. RESULTADOS

Se procesaron un total de 180 muestras de sangre completa, las cuales correspondieron a 15 muestras por cada una de las granjas. En la figura 2, se muestra uno de los corrimientos que se realizaron de la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados obtenidos empleando DNA de distintos aislados de App de una de las granjas muestreadas, donde C1 es el control negativo, MTM es el marcador de tamaño molecular y los carriles I al XIII son las muestras problema. La interpretación de la técnica consiste en tomar como positivas aquellas donde las bandas de ADN amplificado fluorescen a un nivel de 377 pb. Donde se puede observar que las muestras de los carriles III, IV, VI, XI y XIII que éstas muestras son positivas a la identificación de App.

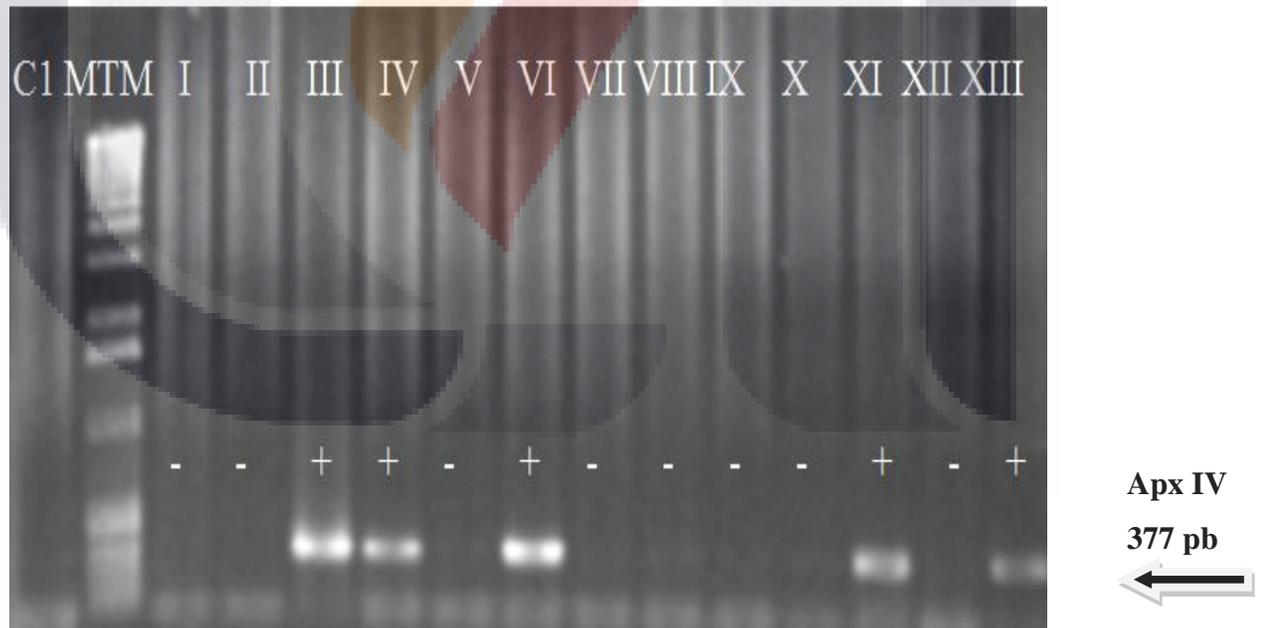


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa.

En cuanto a la distribución de frecuencias del total de muestras de sangre completa obtenida de los cerdos, los resultados se muestran en la Figura 3, donde se puede observar, que de las 180 muestras, 63.88% fueron negativas y 36.11% positivas a App.

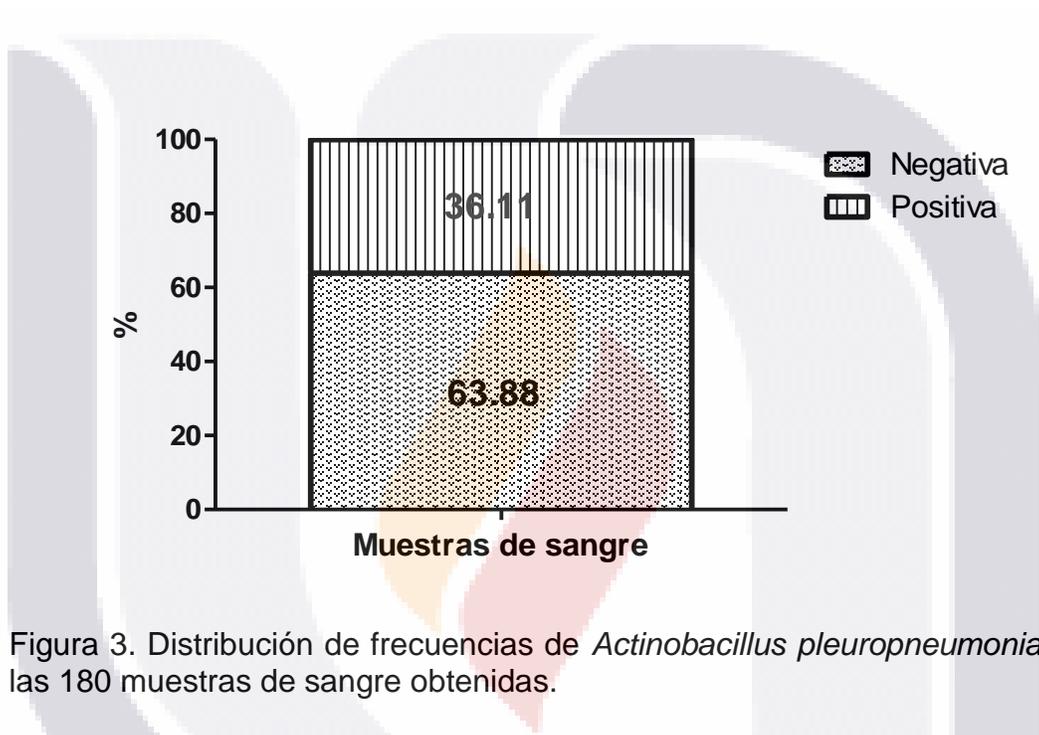


Figura 3. Distribución de frecuencias de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en las 180 muestras de sangre obtenidas.

La distribución de frecuencias para cada una de las granjas porcícolas seleccionadas del estado de Aguascalientes en la que se presentó *A. pleuropneumoniae*, como resultado de los 15 muestreos de sangre realizados, se observa en la figura 4. Donde se observa que la granja 9, muestra la menor prevalencia correspondiente al 20.0%, las granjas 4, 5, 8, 10 y 11 una prevalencia intermedia del 26.66%, las granjas 1,2,3,6 y 7 con valores cercanos al 40.0% y la granja 12 mostró la prevalencia más alta de las granjas estudiadas con un valor correspondiente al 80.0%.

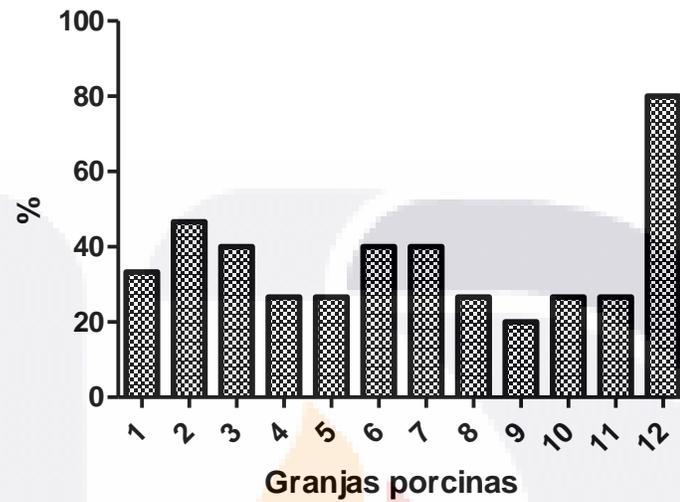


Figura 4. Distribución de la frecuencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, por granja muestreada.

## 8. DISCUSIONES

En éste trabajo de investigación se pudo demostrar que con el tipo de muestreo aleatorio por cuotas, se puede seleccionar animales en tres condiciones sanitarias distintas: sanos, enfermos y asintomáticos ya que cada uno de los cerdos muestreados tuvieron la misma probabilidad de ser elegidos para la identificación de App en éste estudio. Los estudios realizados por Hernández *et al.*, 2002 demostraron la presencia de *A. pleuropneumoniae*, en cerdos que actúan como portadores sanos. Además esto se relaciona con reportes realizados por éstos mismos autores, quienes informan que la mayoría de las piaras a nivel mundial están endémicamente infectadas con *A. pleuropneumoniae* y sólo una pequeña proporción de granjas presenta cerdos con la enfermedad clínica.

En este estudio se pudieron observar las ventajas del uso de PCR para la identificación de App en muestras de sangre completa, ya que nos permitió realizar un diagnóstico confiable, a la fecha no hemos encontrado información en donde se refiera que puede ser identificado el *A. pleuropneumoniae* en éste tipo de tejido; con ésta investigación se demuestra que es un tejido en el que se puede hacer un muestreo no invasivo, permitiendo hacer monitoreo constante de la piara sin tener que realizar sacrificio como ocurre en otro tipo de técnicas y de tejidos. La confiabilidad en la técnica de PCR es debida a sus características de su sensibilidad y especificidad como lo han indicado Liu *et al.*, 2007. Contra otros estudios que reportan que se detecta éste microorganismo con otras técnicas de diagnóstico, en las cuales no se obtienen resultados confiables, como las que ha mencionado Williams *et al.*, 2000; dado a que el *A. pleuropneumoniae* se encuentra asociado con *P multocida*, *H parasuis* e incluso *M hyopneumoniae*, lo que complica su identificación. Otra razón por la cual lo tras técnicas diferentes al PCR no pueden ser confiables es debido a

que los cerdos vacunados con una vacuna de subunidades conteniendo las toxinas Apx I, Apx II y Apx III resultan negativos a esta técnica, según lo reporta lo reporta Dreyfus *et al.*, en el 2004. En un estudio previo realizado en el rastro de San Francisco de los Romo, por Cornejo en el 2006, se muestrearon 64 cerdos, de los cuales 40 de estos se les detectaron lesiones con pleuroneumonía porcina crónica. A 25 de estos pulmones afectados se les realizó inmunolocalización con anticuerpos específicos, donde fueron aisladas 17 cepas, de las cuales 4 fueron analizadas y confirmadas por PCR lo que confirma la sensibilidad y especificidad de ésta técnica.

El 100% de las granjas porcinas muestreadas, mostraron la detección molecular de App en al menos una de las muestras obtenidas, lo que indica que éste agente está ampliamente distribuido en la mayoría de las granjas del estado de Aguascalientes, coincidiendo con lo reportado por Álvarez *et al.*, 2004. Mientras que los estudios realizados por Auger *et al.*; en el 2009, menciona que el App es uno de los principales agentes bacterianos, asociado con el Complejo Respiratorio Porcino.

En éste estudio se observó que la frecuencia de presentación de *A. pleuropneumoniae*, se encuentra en un rango del 20% al 80%. Esto puede ser debido a que *su propagación es altamente contagiosa y frecuente lo que da como resultado efectos negativos en los parámetros productivos de los cerdos como lo menciona Benga et al., 2009. Otra razón que menciona Buettner et al., en el 2008, pudiera ser la transmisión de la enfermedad de los cerdos sanos o portadores. O bien ya que representan la principal fuente de infección de cerdos susceptibles, facilitando así su dispersión por contacto directo o a través de aerosoles como lo reportan Gottschalk y Taylor en el 2006. Otras causas que han sido reportadas por Stewart y Franklin en el 2008 es la propiedad fenotípica que tiene el App de formar biopelículas,*

siendo éste un factor importante para la colonización, virulencia y transmisión del agente.



## 9. CONCLUSIONES

1. Se comprobó que el método de PCR puede ser utilizada para el diagnóstico, la identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en muestras de sangre.
2. En el 100 % de las granjas muestreadas se encontró al menos un caso positivo a *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
3. La frecuencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas, fue del 20 al 80%.

## 10. LITERATURA CITADA

- Altcheh, J., Biancardi, M., Lapena, A., Ballering, G. y Freilij, H., 2005. Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños, Ricardo Gutierrez, Buenos Aires, Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (Suppl. 2): 41-45.
- Álvarez, F. M., Rodríguez, B. J. C., Ciprián, C. A., Rodríguez G. L., Ayora, T.G., Segura, C. J. C., 2004. Perfil serológico del virus de influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas de Yucatán, México *Vet Méx.* 35 (4): 295-306.
- 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(4):271-7.
- Auger, E., Deslandes, V., Ramjeet, M., Contreras, I., Nash, J.H., Harel, J., Gottschalk, M., Olivier, M., Jacques, M., 2009. Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells. *Infect Immun.* 77(4):1426-41
- Bandara, A., Lawrence, M., Veit, H. y Inzana, T., 2003. Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs, *Infection and Immunity.* 71; 6; 3320-3328.
- Bautista V., Cornejo A., Prieto M., Ontiveros., L., Tenorio, V., Avelar, F.J., Guerrero. A.L., 2003a. Daño tisular en pulmón de cerdo debido a la infección crónica de *Actinobacillus sp.* Memorias décimo simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Aguascalientes 13
- Bautista V., Guerrero B. 2003b. Daño tisular en pulmón de cerdo debido a la infección crónica de *Actinobacillus Sp.* Taller de Investigación. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

- Beddek, A. J., Sheehan, B. J., Bosse, J. T., Rycroft, A. N., Kroll, J.S., Langford, P. R., 2004. Two TonB systems in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their roles in iron acquisition and virulence. *Infect Immun.* 72(2):701-8.
- Bei, W., He, Q., Yan, L., Fang, L., Tan, Y., Xiao, S., Zhou, R., Jin, M., Guo, A., Lv, J., Huang, H., Chen, H., 2005. Construction and characterization of a live, attenuated apxIIICA inactivation mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lacking a drug resistance marker. *FEMS Microbiol Lett.* 1;243(1):21-7.
- Benga, L., Hoeltig, D., Rehm, T., Rothkoetter, H.J., Pabst, R., Weigand, P.V., and Fugato- consortium, I., 2009. Expression levels of immune markers in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infected pigs and their relation to breed and clinical symptoms. *Vet Res.* 5:13.
- Blackall, P.J., Klaasen, H.L.B.M., Van Den Bosch, H., Kuhnert, P., and Frey, J., 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet. Microbiol.* 84:47-52.
- Boekema, B. K., Kamp, E. M., Smits, M. A., Smith, H. E., Stockhofe-Zurwieden, N., 2004. Both Apxl and ApxII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 are necessary for full virulence. *Vet. Microbiol.* 20;100(1-2):17-23.
- Bosse, J. T., Janson, H., Sheehan, B.J., Beddek, A.J., Rycroft, A.N., Simon Kroll, J., Langford, P.R., 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*; pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.* 4:225-35.
- Brockmeier, S. L., Albur, P. G. y Thacker, E. L., 2002. Porcine Respiratory Disease Complex. Chapter 13. *Polymicrobial Diseases*. Edited By Breodgen, Q. & Guthmiller, J. M. ASM Press. Washington D. C. 231-258.
- Buettner, F. F., Bendallah, I. M., Bosse, J. T., Dreckmann, K., Nash, J. H., Langford, P. R., and Gerlach, G. F., 2008. Analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* ArcA regulon identifies fumarate reductase as a determinant of virulence. *Infect. Immun.* 76: 2284-2295
- Chiers, K., Doné, E., Van Overbeke, I., Baele, M., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F., 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infections in closed

swine herds : Infection patterns and serological profiles. *Vet. Microbiol.* 85 :343-352

- Chiers, K., Van Overbeke, I., Donne, E., Baele, M., Ducatelle, R., De Baere, T., Haesebrouck, F., 2001. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsillar swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a dsbE-like gene. *Vet Microbiol.* 8;83(2):147-59.
- Cho, J. G., Dee, S. A., Deen, J., Trincado, C., Fano, E., Jiang, Y., Faaberg, K., Murtaugh, M. P., Guedes, A., Collins, J. E., Joo, H.S., 2006. The impact of animal age, bacterial coinfection, and isolate pathogenicity in the shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols from experimentally infected Pigs. *Can. J. Vet. Res.* 70(4):297-301.
- Cho, W. S., and Chae, C., 2001. Expression of the apxIV gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Comp. Pathol.* 125: 34-40
- Choi, Y. L., Goyal, S. M., Joo, H. S., 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. *Can. J. Vet. Res.* 44(9): 735–737.
- Codina, G. M. G., Tórtola, F. M. T., 2006. Diagnostic utility of nucleic acid detection by real-time polymerase chain reaction; *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24: 539 – 540.
- Cornejo, A. M. G., 2006. *Descripción del daño estructural pulmonar en cerdos portadores crónicos de Actinobacillus Pleuropneumoniae*. Tesis de Maestría en Ciencias Morfológicas, U. A. A., Aguascalientes.
- Cruz, S. T., Tórtora, P. J. L., Veja, M. A., Romero, R. A., Mendoza, E. S., Ciprián, C. A., 2003. Cinética de la infección experimental en cerdos con *Mycoplasma hyopneumoniae* usando inmunofluorescencia. *Vet. Méx.* 34 (1): 61-68.
- da Costa, M. M., Klein, C.S., Balestrin, R., Schrank, A., Piffer, I. A., da Silva, S. C., Schrank, I. S., 2004. Evaluation of PCR based on apxIVA associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. *Curr Microbiol* 48:189-195

- Davies, P. R., Dial, G. D., Marsh, W. E., Bahnson, P. B. 1993. Feasibility of implementing a national swine slaughter monitoring system for the collection of health data from american swine. University of Minnesota.
- Desrosiers, R., 1986. *Haemophilus* epidemiology and control. *Proc. AASP Meeting*. 493-512.
- Dreyfus, A., Schaller, A., Nivollet, S., Segers, R. P., Kobisch, M., Mieli, L., Soerensen, V., Hussy, D., Miserez, R., Zimmermann, W., Inderbitzin, F., Frey, J., 2004. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Vet Microbiol*. 19;99(3-4):227-38.
- Enríquez, V.I., Godinez, V.D., Martínez, Z. R., Serrano, L.J.J., de la Garza, M., Hamer, B.R., Guerrero, B.A.L., 2003. Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a componentes de matriz extracelular de cerdo. *Ciencia Veterinaria*. 9:269-293.
- Enríquez, V.I., Guerrero, A. L., Serrano, J. J., Godinez, D., Rosales, J. L., Tenorio, V., de la Garza, M., 2004. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology*. 150:2391-400.
- Fenwick, B., and Henry, S., 1994. Porcine pleuropneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 204:1334-1340.
- Fittipaldi, N., Broes, A., Harel, J., Kobisch, M., and Gottschalk, M., 2003. Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs. *J Clin Microbiol*. 41(11): 5085–5093.
- Frey, J., 2003a. PCR Detection of microbial pathogens. *Methods In Molecular Biology* 216: 87-95.
- Frey, J., 2003b. Detection, identification, and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Methods In Molecular Biology* 216: 87-95.
- Germán, A. C. G., Camacho, R. J. C., Gallegos, S. J., 2005. Producción de cerdos. Tomado de la red mundial el 19-10-2006:

[http://www.sra.gob.mx/internet/informacion\\_general/programas/fondo\\_tierras/manuales/prod\\_cerdos.Pdf](http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo_tierras/manuales/prod_cerdos.Pdf)

- Gottschalk, M., Broes, A., Mittal, K. R., 2003. Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species? *Vet. Microbiol.* 92:87–101.
- Gottschalk, M., Taylor, D. J., 2006. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En: Straw, B. E., Zimmerman, J. J., D’Allaire, S., *Diseases of Swine*, 9th ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub, 563–576.
- Hamer, B. R., Godínez, D., Enríquez, V., Vaca, P. S., Martínez, Z. R., Talamás R. P., Suárez, G. F. y de la Garza, M., 2004. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin, *Can. J. Vet. Res.* 68; 33–41.
- Harms, P. A., Halbur, P. G. y Sorden, S. D., 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J. Swine Health Prod.* 10, 27–30.
- Hedegaard, J., Skovgaard, K., Mortensen, S., Sorensen, P., Jensen, K. T., Hornshøj, H., Bendixen, C., and Heegaard, M.H.P., 2007. Molecular characterisation of the early response in pigs to experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* using cDNA microarrays. *Acta Vet Scand.* 49 (1): 11.
- Hernández, C. R., Chávez, G. G., Gutiérrez y Pabello, J. L., 2002. Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biotipo 1, Serotipo 1, de pulmones de cerdo con y sin lesiones neumónicas utilizando la técnica de inmunohistoquímica. *Vet. Mex.* 33(4):355-362.
- Hernández, S. R., Fernández, C. C., Baptista, L. P., 2006. Metodología de la investigación, Cuarta Edición, p. 209,419-423, 566.
- Hoeltig, D., Hennig, P. I., Thies, K., Rehm, T., Beyerbach, M., Strutzberg, M. K., Geralch, G.F., Waldmann, K.H., and Fugato- Consortium, I., 2009. A novel Respiratory Health Score (RHS) supports a role of acute lung damage and

- pig breed in the course of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vet Res.* 5:14
- Iglesias, S. G. y Trujano, C. M., 2000. Diversos modelos de interacciones que ocurren en el complejo respiratorio porcino. *Vet. Méx.* 31 (1).
- INEGI, 2005. Tomado de la red mundial el 19-10-2006: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
- Jacobsen, I., Hennig-Pauka, I., Balthes, N., Trost, N. y Gerlach, G., 2005. Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence, *Infection and Immunity*, 73; 1; 226-234.
- Jacques, M., Labrie, J., Michael, F., Cox, A., Paradis, M., Dick, C., Klopfenstein, C., Broes, A. and Fittipaldi, N., 2005. Isolation of an atypical strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 with a truncated lipopolysaccharide outer core and no O-Antigen. *J. Clin. Micro.* 43 (7): 3522-3525.
- Jessing, S.G., Angen, O., Inzana, T.J., 2003. Evaluation of multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2, 5, and 6. *Clin Microbiol* 41(9): 4095-4100.
- Klausen, J., Andresen, L. O., Barfod, K., Sorensen, V., 2001. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 6 in pig serum. *Vet. Microbiol.* 2;79(1):11-8.
- Kobisch, M. and Frey, J., 2003. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from clinical samples and air. *Methods in molecular biology*, VI. 216: PCR detection of microbial pathogens; Methods and Protocols; 247-256.
- Koyama, T., To, H., and Nagal, S., 2007. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15-like strain from a field case of Porcine Pleuropneumonia in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 69(Suppl.9): 961–964.
- Kramer, A., Schwebke, I., and Kampf, G., 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 6:130.

- Kristensen, C. S., Andreasen, M., Ersboll, A. K., Nielsen, J. P., 2004. Antibody response in sows and piglets following vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae*, toxigenic *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can. J. Vet. Res.* 68 (1):66-70.
- Lara, J., Cortes, R., Castro, F., Escamilla, J., Quezada, F., Aranda, M., Lozano, B., Sarfati, D., Soto, E. y Antillón, A. 2006. El diagnóstico molecular y PRRS: Aplicaciones prácticas. *Congreso Nacional AMVEC Ixtapa*, Agosto 16-19; p. 89-95.
- Lasa, I., del Pozo, J. L., Leiva, J. y Penades, J. R., 2005. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar.* 28: 163-175.
- Leal, K.D.S., Martínez, V.I.O., López, M.A., and Martínez, S.J.P., 1995. Single-Step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Cini. Micobiol.* 33(12): 3087-3090
- Liu, H. X., Zhu, P., Zhang, Y., Wang, H. X., DU, J. W., Liu, J., Gu, J. Y. y Ou, Y., 2007. Real-time PCR array for simultaneous detection of 37 kinds of fusion genes in leukemia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 87:526-532.
- Liu, J., Chen, X., Tan, C., Guo, Y., Chen, Y., Fu, S., Bei, W., Chen, H., 2009. In vivo induced RTX toxin Apx IVA is essential for the full virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol.* 137 (3-4): 282-9.
- 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. *J Vet Res.* 72:242–248
- MacLean, L., Perry, M. y Vinogradov, E., 2004. Characterization of the antigenic lipopolysaccharide O chain and the capsular polysaccharide produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 13, *Infection and Immunity.* 72; 10; 5925-5930.
- Maes, D., Chiers, K., Haesebruck, F., Laevens, H., Verdonck, M., and de Kruif, A., 2001. Herd factors associated with the seroprevalences of *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae* serovars 2,3 and 9 in Slaughter Pigs form Farrow-to-finish pig herds. *Vet. Res.* 32(5)409-419.
- Mondaca, F. E., Murtaugh, M. P. y Morrison, R. B., 2006. Association between genetic sequence homology of *Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus* and geographic distance between pig sites. *Can. J. Vet. Res.* 70(3): 237–239.
- Morales, A., Martinez, I., Carlos, A., Alvarez, G., Alvarez, M., Maldonado, J., 2005. Comparison of histopathology, culture and PCR for diagnosis of bovine tuberculosis. *Revista Científica-Facultad de Ciencias Veterinarias* 15 (2): 103-108.
- Morilla, A. D., González, V. D. y Aguirre, 1996. Los perfiles serológicos y microbiológicos para evaluar el estado sanitario de las granjas porcinas. *Ciencia Veterinaria* 7: 273-313.
- Morilla, A., Yoon, K. y Zimmermen, J., 2004. *Enfermedades víricas emergentes del cerdo*. 1<sup>er</sup> edición. Editorial Multimédica, ediciones veterinarias. España, 442 pp.
- Nazar, J. 2007. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolargol.* 67: 61- 72.
- Opriessnig, T., Thacker, E. L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.-J. y Halbur, P. G., 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual-infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 41, 624–640.
- Pérez, R.M., Bulnes, C., Abeledo, M.A., Rueda, D., y Durand R., 2003. Reducción de la incidencia de neumonías en cerdos al sacrificio mediante la aplicación de un esquema de tratamiento basado en el uso de aivlosin fg 50 + chlortet fg 150. *Rev. Salud Anim.* 25(3): 162-166
- Pijoan, C., and Ruiz, A., 2001. Transmisión of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *PR Prog.* 17: 14-15.
- Prieto, M. C. K., 2006. *Detección y caracterización de estructuras tipo granulomas en la pleuropneumonia porcina crónica*. Tesis de Maestría en Ciencias Morfológicas, U. A. A., Aguascalientes.

- Rayamajhi, N., Shin, S.J., Kang, S.G., Lee, D.Y., Ahn, J.M. and 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.* 17: 359-362.
- Sambrook, J. and Rusell, D., 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 3<sup>er</sup> edición, editorial CSHL, E.U.A., pp. 213- 215.
- Schaller, A., Kuhnert, P., de la Puente-Redondo, V.A., Nicolet, J., Frey, J., 2000. Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. *Vet Microbiol.* 74:365–376.
- Schooling, S. and Beveridge, T., 2006. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of Bacteriology.* 188(16): 5945-5957
- Schuchert, A. J., Inzana, T. J., Angen, and Jessing, S., 2004. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. *J. Clin. Micro.* 4344–4348.
- Sheehan, B., Bosse, J., Beddek, A., Rycroft, A., Kroll, J., and Langford, P., 2003. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host, *Infection and Immunity*, 71; 7; 3960-3970.
- Silin, S., Lyubomska, O., Weng, N., 2001. *Mycoplasma Hyopneumoniae* vaccination influence on porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma Hyopneumoniae* coinfection. Odessa State Agricultural Institute, Ukraine.
- Sixou, M., 2003. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy; *Oral Diseases.* 9 (Suppl. 1): 54-62
- Stewart, P. and Franklin, M., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms, *Nature Reviews*, 6; 199- 210.
- Sthitmatee, N., Sirinarumitr, T., Makonkewkeyoon, L., Sakpuaram, T., and Tesaprateep, T., 2003, Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype using PCR based-apx genes. *Mol Cell Probes* 17:301–305.

- Takashima, H., Sakay, H., Yanai, T., Masegi, T., 1997. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1,2,5 and 7 using the immunohistochemical staining. *J Vet Med Sci.* 61:713-716.
- Tegetmeyer, H.E., Jones, S.C., Langford, P.R., Baltes, N., 2008. ISAp11, a novel insertion element of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, prevents ApxIV-based serological detection of serotype 7 strain AP76. *Vet Microbiol.* 128(3-4):342-53
- Torremorell, M., Pijoan, C., Ruiz, A., Mendoza, S., 2006. Transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una granja con separaciones abiertas o sólidas determinada por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa; *Vet. Méx.* 37 (2): 181-190.
- Torremorell, M., Pijoan, C., Janni, K., Walker, R and Joo, H.S., 1997. Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. *Am. J. Vet Res.* 58:(8): 828-832.
- Torres, M., Williams, J. J., Castro, F. J., Salazar, M., 2000. Frecuencia de rinitis atrófica y grado de lesión de los cornetes nasales de cerdos en Yucatán, México. *Rev Biomed* 11:99-105.
- Torres, M., Williams, J. y Gutiérrez, E., 1997. Serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y prevalencia de lesiones pulmonares en cerdos sacrificados en el rastro municipal de Mérida, Yucatán. *Avances en Investigación Agropecuaria* 6, 16-25.
- Tumamao, J. Q., Bowles, R. E., Van den Bosch, H., Klaasen, H. L., Fenwick, B. W., Blackall, P. J., 2004. An evaluation of the role of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1 and 15 in the protection provided by sub-unit and live streptomycin-dependent pleuropneumonia vaccines. *Aust. Vet. J.* 82(12):773-80.
- Wagner, T., and Mulks, M., 2007. Identification of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* leucine-responsive regulatory protein and its involvement in the regulation of in vivo-induced genes. *Infection and Immunity.* 75 (11): 91-103.

- Williams, J. J., 2002. *Efecto del uso de antibióticos en casos clínicos de enfermedades del tracto respiratorio sobre la ganancia de peso en cerdos de engorda*. Tesis de Doctorado en Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima.
- Williams, J., Torres, M. y 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.
- Williams, J., Torres, M., Salazar, R., Chan, P. y Echeverría, P., 1998. Lesiones histológicas en pulmones de cerdos con aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*. En: Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios (Ed.). *Memorias Del VII Congreso de la Sociedad Mexicana De Patólogos Veterinarios*. p. 23. Manzanillo: México.
- Zhou, L., Jones, S. C. P., Angen, Bosse, J. T., Nash, J. H. E., Frey, J., Zhou, R., Chen, H. C., Kroll, J. S., Rycroft, A. N., and Langford, P. R., 2008. Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross- reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains. *J Clin Microbiol.* 46(2): 800–803.