

**TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO EXISTENTES PARA LA DETECCIÓN
DE *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* CAUSANTE
DE LA PLEURONEUMONÍA PORCINA**

**DIAGNOSTIC TECHNIQUES FOR THE DETECTION
OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* THE CAUSATIVE
AGENT OF PORCINE PLEUROPNEUMONIA**

DENNIS W. MUÑOZ V.*

ABSTRACT

In this review the principal diagnostic techniques for the detection of Actinobacillus pleuropneumoniae (App) are described. A brief introduction about the most outstanding aspects of this important swine disease that causes great economics losses around the world is considered. The description of each technique will include their main advantages and disadvantages, and also the revolutionaries techniques that are under study. All this, in order to choose and standardize, a specific technique that should be sensible, fast and cheap for the national swine industry.

KEY WORDS: Actinobacillus pleuropneumoniae; porcine pleuropneumonia; diagnostics techniques; pigs.

PALABRAS CLAVE: Actinobacillus pleuropneumoniae; pleuroneumonía porcina; técnicas de diagnóstico, cerdos.

INTRODUCCIÓN

A pesar de los cambios que ha sufrido la producción porcina en los últimos años, basados principalmente en el destete temprano segregado, producción en diferentes sitios y el sistema de manejo todo adentro todo afuera, así como un fuerte incremento en el tamaño de las poblaciones, los cuadros respiratorios continúan siendo responsables de importantes pérdidas económicas en esta industria (Del Río *et al.*, 2003). Dentro de estos cuadros respiratorios destaca la pleuroneumonía causada por la bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* más conocida como App (Iglesias, 2000; Kim *et al.*, 2004;

Laval, 2000; Straw *et al.*, 2000; Torremorell *et al.*, 1997).

La enfermedad fue observada por primera vez a fines de los años 50 (Pattison citado por Straw *et al.*, 2000), y en la actualidad la enfermedad se encuentra diseminada en todo el mundo (Deneer y Potter, 1988; Dreyfus *et al.*, 2004; Fittipaldi *et al.*, 2003; Maes *et al.*, 2001; Moser *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001).

El agente etiológico es una pequeña bacteria Gram negativa con morfología cocobacilar típica, inmóvil, no esporulada y anaerobia facultativa (Gutiérrez *et al.*, 1997; Leman *et al.*, 1994; Vadillo *et al.*, 2002). Basados en los requerimientos de NAD (NAD: dinucleótido de adenina y nicotinamida, factor sanguíneo V) esta bacteria puede ser dividida en biotipo 1 (NAD - dependiente) y en biotipo 2 (NAD - independiente) (Gutiérrez *et al.*, 1997; Haesebrouck *et al.*, 1997; Maldonado *et al.*, 2004). Recientemente se ha unificado el sistema en un solo biotipo con 15 serotipos, con la particularidad de

* Med. Vet. dennismunoz@udec.cl Escuela de posgraduados. Departamento de Patología Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Concepción, Campus Chillán, Avenida Vicente Méndez 595, casilla 537, Chillán. Chile.

que en los serotipos 2, 4, 7, 9, 13 y 14 pueden aislarse cepas independientes del factor NAD (Maldonado *et al.*, 2004; Rodríguez, 2001).

SEROTIPOS

En virtud del tipo de antígeno capsular (antígeno K) se han establecido, hasta ahora, 15 serotipos (Angen y Jessing, 2004; Ciprián *et al.*, 2004; Del Río *et al.*, 2003; Dreyfus *et al.*, 2004; Fittipaldi *et al.*, 2003). A su vez, la complejidad estructural de este antígeno ha generado subtipos o subserotipos. Esto ya ha ocurrido con los serotipos 1 (1a y 1b) y 5 (5a y 5b) (Haesebrouck *et al.*, 1997; Leman *et al.*, 1994).

Otro antígeno interesante es la cadena lateral "O" del lipopolisacárido bacteriano (LPS) que es diferente en los distintos serotipos, excepto en los serotipos 1, 9 y 11; serotipos 3, 6 y 8 y serotipos 4 y 7 en los que la estructura química de la cadena O es similar o incluso idéntica. Lo anterior genera reacciones cruzadas si se utilizan estos antígenos para el diagnóstico (Gutiérrez *et al.*, 1997; Haesebrouck *et al.*, 1997; Leman *et al.*, 1994).

EPIDEMIOLOGÍA

La pleuroneumonía es una de las enfermedades respiratorias más importantes en la producción porcina (Williams *et al.*, 2001; Desrosiers, 2000; Gottschalk, 1998; Huerta *et al.*, 2004; Iglesias, 2000). Se han descrito brotes en casi todos los países europeos, en Estados Unidos, Canadá, México, Sudamérica, Japón, Taiwán, y Australia (Moser *et al.*, 2004; Straw *et al.*, 2000). Dentro de los diferentes serotipos descritos para App, los serotipos 1, 5, y en menor grado el serotipo 7, son responsables de casi el 95% de los casos clínicos de pleuroneumonía en Norteamérica (Gottschalk, 1998). En Europa los serotipos predominantes son el 2 y 9 (Marsteller y Fenwick, 1999) y en nuestro país se han detectado los serotipos 1 y 5 (Chiers, 2003 extraído de Dubreuil *et al.*, 2000), y más recientemente el serotipo 12 (comunicación personal, Dr. Álvaro Ruiz) sin conocerse otros estudios relacionados.

La principal ruta de diseminación es por aire y la transmisión se da por contacto directo de cerdo a cerdo o por gotitas dentro de cortas distancias. La sobrevivencia media del App en el ambiente se ha estimado en 30 minutos a 27 grados Celsius (Baekbo,

2002). Sin embargo, cuando están protegidos por mucosidad u otra materia orgánica, pueden sobrevivir por varios días (Straw *et al.*, 2000).

La transmisión entre diferentes planteles se produce por la introducción de animales portadores dentro de poblaciones libres de la enfermedad (Biberstein y Chung Zee, 1990).

SIGNOS CLÍNICOS

Durante un brote de App, el criadero puede presentar individualmente cerdos con neumonía hiperaguda, aguda, subaguda y crónica (Carter *et al.*, 1995; Del Río *et al.*, 2003; Maes *et al.*, 2001), pudiendo estar afectados cerdos de cualquier edad, aunque los de edades entre las 12 y 16 semanas son los más susceptibles (Biberstein y Chung Zee, 1990; Marsteller y Fenwick, 1999). La forma hiperaguda se caracteriza por presentar cerdos con fiebre (41,5 °C), apatía y anorexia (Rycroft, 1999). La piel se vuelve cianótica y en la fase terminal culmina con una disnea grave, postura de perro sentado y una secreción copiosa, espumosa, teñida de sangre a través de las fosas nasales y la boca (Quinn *et al.*, 2002; Straw *et al.*, 2000). En los casos agudos los cerdos presentan una marcada pérdida de peso, que es aparente a las 24 horas de establecida la enfermedad. Los cerdos con cuadros subagudos o crónicos se les identifica por su intolerancia al ejercicio, bajo apetito y una reducción en la ganancia diaria de peso, provocando una disminución en la productividad (Moser *et al.*, 2004; Rycroft, 1999).

VIRULENCIA Y PATOGÉNESIS

Observaciones de campo e infecciones experimentales han demostrado que los serotipos más patógenos son 1a, 1b, 5a, 5b, 9 y 10 (Haesebrouck *et al.*, 1997; Sanford, 1998). Dentro de los factores de virulencia más importantes, las citotoxinas RTX (Repeats in structural toxins) o toxinas *Apx*, son las principales. Estas toxinas, de las que existen 4 tipos, son formadoras de poros en células como neutrófilos y macrófagos alveolares (Tabla 1) (Carter *et al.*, 1995; Quinn *et al.*, 2002; Sanford, 1998; Shin *et al.*, 2003; Vadillo *et al.*, 2002; Woolcock, 1991). La última toxina en describirse fue la toxina *ApxIV* que es producida por los 15 serotipos de App (Cho *et al.*, 2002; Dreyfus *et al.*, 2004; Vadillo *et al.*, 2002).

TABLA 1
TOXINA RTX (REPEATS IN STRUCTURAL TOXINS)
DE *A. PLEUROPNEUMONIAE*

<i>Exotoxina</i>	<i>Serotipos</i>	<i>Actividad patógena</i>
Apx I	1, 5, 9, 10, 11 y 14 biot. II.	Fuertemente hemolítica y citotóxica.
Apx II	En todos, excepto en 10 y 14	Débilmente hemolítica y citotóxica.
Apx III	2, 4, 6, 8 y 15	Fuertemente citotóxica.
Apx IV	En todos los serotipos	Moderadamente hemolítica (nueva)

Se ha aceptado que el patógeno ingresa al animal a través de la inhalación y que el proceso inflamatorio y de necrosis por coagulación provocado, es crucial en el desarrollo temprano de las lesiones. Las hemolisinas atacan a los glóbulos rojos, mientras que las citotoxinas dañan macrófagos y neutrófilos. Se piensa que la formación de inmunocomplejos (endotoxina-anticuerpo) en el endotelio sería también responsable de la vasculitis, trombosis, edema, necrosis y de las hemorragias características de la enfermedad (Carter *et al.*, 1995; Ciprián *et al.*, 2004; Vadillo *et al.*, 2002).

Otros componentes de la bacteria que juegan un rol importante en la patogenia son: la cápsula, adhesinas, proteínas captadoras de hierro, proteínas de la membrana externa y proteasas secretadas (Archambault *et al.*, 2003; Bélanger *et al.*, 1995; Carter *et al.*, 1995; Haesebrouck *et al.*, 1997; Quinn *et al.*, 2002; Woolcock, 1991).

En conclusión, debido a la vía de entrada del agente al pulmón, a sus factores de virulencia y la consiguiente reacción inmunológica del cerdo es que se manifiesta una enfermedad caracterizada por una neumonía hemorrágica necrotizante y una pleuritis fibrinosa (Biberstein y Chung Zee, 1990; Carter *et al.*, 1995; Del Río *et al.*, 2003; Gutiérrez *et al.*, 1997).

DIAGNÓSTICO

En el caso particular de la Pleuroneumonía porcina, la anamnesis es de gran utilidad para sospechar de la presencia de la enfermedad. Así nos encontramos, según Quinn *et al.* (2002), con historias de planteles que presentaron brotes de enfermedades pulmonares posteriores a fallas en el sistema de ventilación o un descenso abrupto de la temperatura ambiental.

Necropsia

La presentación clásica en la necropsia son lesiones fibrinosas y necróticas demarcadas, que se ubican, generalmente, en el lóbulo diafragmático, cardíaco y lóbulos apicales (Buret *et al.*, 2004). Estas áreas neumónicas son oscuras y consolidadas (Figuras 1 y 2), y la pleuresía fibrinosa presente es no-



Figura 1. Áreas neumónicas del pulmón oscuras y consolidadas, además de adherencias sobre la pleura visceral. (Fotografía Departamento Patología Animal. U. de Ch.).



Figura 2. Pulmón con focos de pleuroneumonía y capa de fibrina sobre la pleura visceral. (Fotografía Departamento Patología Animal. U. de Ch.).

toria, especialmente en los lugares neumónicos (Busso y Ambrogi, 1990; Marsteller y Fenwick, 1999). Por otro lado, cerdos crónicamente infectados tienen adherencias pleurales y abscesos que pueden ser encontrados en el pulmón u otros tejidos. Sin embargo, la presencia de las lesiones anteriormente descritas no son patognomónicas de pleuroneumonía porcina, por lo que se recomienda confirmar el hallazgo, a través de otras técnicas de diagnóstico, más sensibles y específicas, las cuales requieren de toma de muestras.

Toma de muestra

Debe incluir material procedente de las lesiones pulmonares con pleuritis. Entre las muestras más utilizadas se incluyen los lavados traqueobronquiales, porciones del pulmón afectadas, biopsias tonsilares o tonsilas completas recolectadas en el matadero (Fittipaldi *et al.*, 2003; Quinn *et al.*, 2002). Para estudios histopatológicos las muestras deben fijarse en formol al 10% tamponada. Para otras técnicas de diagnóstico, el medio de transporte debe ser el adecuado y en lo posible las muestras deben ser refrigeradas (Vadillo *et al.*, 2002).

Histología

La lesión histológica se caracteriza por necrosis de los pulmones, con hemorragia, infiltración de neutrófilos, macrófagos y activación plaquetaria, trombosis vascular, edema y exudado fibrinoso (Vadillo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001). Además se pueden ver microcolonias de organismos en los alvéolos infectados, que pueden causar bacteremia (Straw *et al.*, 2000).

Es importante señalar que el agente etiológico no se puede determinar solamente con la inspección postmortem e histopatología. Además lo más complejo del diagnóstico de App es identificar los planeles infectados subclínicamente, ya que sus animales portadores son los principales responsables en la diseminación de la enfermedad (Angen y Jessing, 2004; Gottschalk, 1998; Henning *et al.*, 2004).

Aislamiento bacteriológico

Una vez recibidas las muestras de pulmón, éstas deben ser teñidas con tinción Gram, en donde se observarán numerosos cocobacilos gramnegativos (Biberstein y Chung Zee, 1990; Straw *et al.*, 2000). En el caso particular de App biotipo I es necesario proporcionarle el factor V (suministrado por una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*) para su cultivo en agar con sangre ovina al 5% (O'Reilly y Ni-

ven, 2002). Luego de 12 horas de incubación aeróbica aparecen colonias, en la vecindad de la cepa nodriza, rodeadas por una zona clara de hemólisis completa (Carter *et al.*, 1995; Straw *et al.*, 2000; Vadillo *et al.*, 2002). Otro medio que se puede utilizar es el agar Chocolate (Agar sangre alterada por calentamiento con liberación del factor V), el cual permite el crecimiento de la bacteria en una atmósfera del 5% de CO₂ a 37 °C (Quinn *et al.*, 2002; Straw *et al.*, 2000). Si es biotipo II el causante de la infección no necesita del factor NAD para su crecimiento (Gutiérrez *et al.*, 1997).

La identificación bioquímica puede llevarse a cabo para demostrar el fenómeno CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen), actividad ureasa y fermentación del manitol (Fey, 1978). Sin embargo, en infecciones mixtas se recomienda el uso de medios selectivos. Debido a todo lo anterior, la identificación por aislamiento puede ser confusa, complicada y relativamente insensible, especialmente en casos crónicos (Cho *et al.*, 2002). Además no es la única bacteria que es NAD dependiente, por lo que son necesarias técnicas moleculares para su identificación. No obstante, el aislamiento primario entrega información para conocer la susceptibilidad a los antimicrobianos del serotipo específico y sigue siendo considerada, por algunos investigadores, como la técnica estándar ("gold standard") para diagnosticar App (Desrosiers, 2000).

Finalmente, el aislamiento bacteriano no es viable en animales portadores, que son los principales responsables del contagio de criaderos que están libres de la enfermedad (Gottchalk, 1998). Además la técnica requiere de mucho tiempo y trabajo. Así, por la razón anteriormente citada, hoy en día es más recomendable identificar el organismo a través de técnicas serológicas o moleculares, que discutiremos a continuación.

Técnicas mediadas por anticuerpos que detectan al antígeno

Inmunohistoquímica. Esta técnica utiliza anticuerpos (Ac) conjugados con enzimas como inmunoperoxidasa o fosfatasa alcalina. La inmunohistoquímica directa requiere de anticuerpos marcados dirigidos a un epítipo específico del App. Por otra parte, la inmunohistoquímica indirecta consiste en un complejo de Ac específico al antígeno y un anti-Ac marcado con el complejo enzimático (Janeway *et al.*, 2000). Hernández *et al.* (2002) utilizaron la técnica de inmunohistoquímica, con el complejo avidina-biotina-peroxidasa para detectar el serotipo 1,

desde muestras de pulmón. Sus resultados son aplicables sólo al serotipo 1, ya que se requiere de Ac monoclonales para cada serotipo. Su ventaja es que puede estudiar la relación del agente con las células que ataca, lo que demuestra su gran utilidad en investigación, pero no para la industria porcina, por ser una técnica laboriosa y costosa (Órdenes *et al.*, 2004).

Inmunofluorescencia. Esta técnica conjuga pigmentos fluorescentes, como el isotiocianato de fluoresceína al Ac. También se requiere de un microscopio de fluorescencia, lo que se convierte en una desventaja (Órdenes *et al.*, 2004). Rosendal *et al.* (1981) aplicaron esta técnica a la identificación y serotipado de App; sin embargo, con esta técnica se han detectado reacciones cruzadas (Gutiérrez *et al.*, 1997).

Separación inmunomagnética. Técnica altamente sensible que aísla al agente utilizando imanes (pequeñas esferas) cubiertos con anticuerpos específicos al serotipo de App. Luego la flora contaminante es lavada y se obtiene un cultivo 1.000 veces más puro que el cultivo directo en agar. La principal desventaja es su elevado costo (Gottschalk, 1998; Marsteller y Fenwick, 1999; Vadillo *et al.*, 2002).

Detección directa del antígeno por métodos moleculares

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El PCR constituye uno de los avances más importantes de la Biomedicina. Es una reacción que utiliza ADN, enzima polimerasa y oligonucleótidos (primers) para amplificar fragmentos específicos del ADN. Consta de tres pasos fundamentales: desnaturalización, anillado (annealing) o hibridación de los partidores y extensión (Fittipaldi *et al.*, 2003; Rodríguez, 2001). Esta herramienta genética ha sido estandarizada para identificar App, desde un cultivo mixto de bacterias proveniente de muestras de tonsilas y desde tejidos necróticos (Angen y Jessing, 2004; Cho *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 1997; Gottschalk *et al.*, 2004). Ésta genera la gran ventaja de poder diferenciar entre App y otras bacterias como *A. porcinotonsillarum* (Gottschalk, 1998; Gottschalk *et al.*, 2004; Quinn *et al.*, 2002). Fittipaldi *et al.* (2003) y Maldonado *et al.* (2004) utilizaron PCR para detectar App, de ambos biotipos, en cerdos portadores o subclínicos y han estandarizado el procedimiento en muestras de tejidos (biopsias), tonsilas completas y desde cultivos directos.

Hibridación *in situ* (ISH). La hibridación de los ácidos nucleicos fue una de las primeras técnicas de ADN utilizadas. Para la ISH se requiere de trozos de tejido que son sometidos a una digestión del ADN bacteriano, amplificación y visualización al microscopio (Cho *et al.*, 2002). Cho *et al.* (2002) desarrollaron la hibridación *in situ* para la detección del gen *apxIV*, a través de sondas de DNA marcadas con digoxigenina, que reconocían el citado gen, desde pulmones de cerdos inoculados experimentalmente. Ésta demostró ser una herramienta valiosa en el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina, cuando sólo se utilizan tejidos fijados en formalina como muestras para diagnóstico. Lo que es una desventaja para otro tipo de muestra.

Técnicas que detectan anticuerpos

App es una bacteria que presenta una complejidad particular, debido a la existencia de varios serotipos. Es así como en un mismo plantel pueden coexistir varios serotipos y otras bacterias relacionadas, convirtiendo al diagnóstico serológico en todo un reto (Inzana y Fenwick, 2001). Algunos de los tests serológicos que se han utilizado en la detección del App son los siguientes:

Coagulación. Consiste en la aglutinación del complejo Ag-Ac haciéndolo visible (Alcántara *et al.*, 2004; Fey, 1978; Roitt *et al.*, 1993; Straw *et al.*, 2000). Para su desarrollo se requiere una cepa bacteriana que sintetice grandes cantidades de proteína A (cepa de *S. aureus*), que se une a la región Fc de las IgG, quedando libre la región Fab, dispuestas para reaccionar con su antígeno específico (Rodríguez, 2001). No obstante, se han presentado reacciones cruzadas, por ejemplo, entre los serotipos 1, 9 y 11 (Biberstein y Chung Zee, 1990; Marsteller y Fenwick, 1999; Vadillo *et al.*, 2002).

Fijación del complemento. El test se basa en la obtención de antígenos específicos para cada uno de los 15 serotipos, que reaccionan frente al suero investigado. Los antígenos se obtienen del sobrenadante de una suspensión de bacterias. Adicionalmente, se requiere de complemento, suero bovino fetal, y del suero problema, los que son incubados durante 12 horas. Luego de este periodo se añaden los glóbulos rojos. Si el suero porcino contiene anticuerpos específicos frente al antígeno del serotipo investigado, interaccionarán con él y el complemento se unirá a la porción Fc del anticuerpo. Esto agotará el complemento presente y evitará la lisis de los glóbulos rojos en el sistema de reacción (Rodríguez, 2001). En el caso del App fue inicial-

mente utilizado para detectar diferentes anticuerpos; sin embargo, presenta una sensibilidad y especificidad muy reducida para ser una técnica confiable en la detección rutinaria de App en laboratorios clínicos o como prueba de campo (Inzana y Fenwick, 2001). Schaller *et al.* (2004) demostraron lo anterior al comparar el test de fijación del complemento con un Kit ELISA que fija la exotoxina ApxIV. El experimento evidenció que el test de fijación del complemento erraba en el diagnóstico de piaras infectadas, no así ELISA, que mostró una mayor sensibilidad y especificidad.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). ELISA conjuga químicamente una enzima con el anticuerpo, que al reaccionar cambia de un estado incoloro a uno coloreado. El componente no marcado se acopla a un soporte sólido (placa de múltiples pocillos). Lo más común es que el antígeno se acople a la placa y que se analice con el anticuerpo marcado (ELISA directo). Esta unión bloquea cualquier absorción no específica, y a continuación se lavan los pocillos de anticuerpos y de otras proteínas libres (Janeway *et al.*, 2000).

El diagnóstico serológico basado en LPS y antígenos capsulares de App nos ofrece hoy en día varios tests ELISA (serodiagnósticos) específicos para ciertos serotipos como 1, 2, 4, 5, 6 y 7 (Eriksen, 2004; Gutiérrez *et al.*, 1997; Wallgren *et al.*, 2004). Sin embargo, no existe un test único que discrimine entre los distintos serotipos (Marsteller y Fenwick, 1997; Sanford, 1998).

Un estudio llevado a cabo por Inzana y Fenwick (2001) desarrolló un ELISA específico para los serotipos que afectaban principalmente a Norteamérica (1, 5 y 7). Debido al problema de reacciones cruzadas, por epítopes comunes entre los diferentes serotipos y otras especies de bacterias, este estudio utilizó el polisacárido capsular o antígeno capsular por ser serotipo-específico. Se realizaron ELISAs específicos para cada serotipo y un ELISA que combinó a los tres serotipos en una sola placa, obteniendo resultados positivos, para detectar diferentes anticuerpos (provenientes de una misma muestra de suero) contra serotipos distintos de App.

Recientemente Dreyfus *et al.* (2004) desarrollaron un ELISA indirecto utilizando la exotoxina ApxIV recombinante, que presenta la particularidad de ser producida por los 15 serotipos, actualmente identificados. Su utilidad es primordial, ya que identificaría a los animales enfermos agudos y crónicos con App. Las desventajas son dos: no discrimina

entre los distintos serotipos existentes y el resultado podría ser negativo en animales portadores, por cuanto el gen ApxIV sólo se expresa en animales que presentan el cuadro clínico (Schaller *et al.*, 2004).

ELISA dirigidos contra ApxII y ApxIII han mostrado reacciones positivas en cerdos que eran libres de App, debido a una interacción cruzada con otras especies de *Actinobacillus spp.*, como *A. suis*, *A. rossii* y *A. porcintoncillarum*. Así el atractivo proporcionado por estas exotoxinas, en la detección vía ELISA de App, es un tanto decepcionante (Dreyfus *et al.*, 2004).

En el caso particular de Chile, los serotipos aislados han sido el 1 y 5 (Chiers, 2003 extraído de Dubreuil *et al.*, 2000) y más recientemente el serotipo 12 (comunicación personal de Dr. Álvaro Ruiz); sin embargo, no existen estudios epidemiológicos en los planteles chilenos que descarten otros serotipos. Se debe considerar que los serotipos 1 y 5 son de alta patogenicidad y se cree que ingresaron a nuestro país desde Norteamérica, donde son los serotipos prevalentes. Al respecto, Inzana y Fenwick (2001) ya aislaron el antígeno capsular correspondiente al serotipo 1, 5, y 7, útiles para los fabricantes de tests serológicos.

Otro aspecto importante es que la pleuroneumonía no sólo se puede diagnosticar por medio de la búsqueda de anticuerpos creados contra App o sus propios antígenos. También existe la posibilidad de conjugar los tests ya existentes, con la detección de proteínas que exprese el animal, cuando el equilibrio entre el sistema inmunológico y la flora respiratoria se vean alterados. Así lo evidenció un estudio llevado a cabo por Henning *et al.* (2004) que utilizó un ELISA para detectar péptidos antimicrobianos, producidos por animales enfermos agudos, crónicos, subclínicos y portadores. La determinación de esta proteína descubierta (PR-39) podría crear las bases de una nueva herramienta diagnóstica para identificar a los animales sanos portadores del patógeno.

Para finalizar, existen otras técnicas que se han probado para la detección de anticuerpos contra App. No obstante, todas presentan la desventaja de las reacciones cruzadas entre serotipos o bacterias relacionadas filogenéticamente. Entre ellas se encuentran las siguientes:

Precipitación en gel o inmunodifusión. Se basa en la difusión de los antígenos y anticuerpos en un gel de agar, con la consiguiente precipitación visible como una línea cuando ambos forman complejos (Fey, 1978; Gunnarson *et al.*, 1978). El incon-

veniente es su lentitud y la difícil interpretación de las bandas de precipitación (Gunnarsson, 1979).

Hemaglutinación indirecta. La técnica consiste en la suspensión de las células bacterianas en solución salina durante 12 horas, la cual es centrifugada y, posteriormente, se recoge el sobrenadante. Este extracto salino se incuba una hora en presencia de glóbulos rojos de oveja, de tal forma que los antígenos bacterianos se adsorban a la superficie de los eritrocitos. Finalmente, se tapizan las placas de microtitulación con la suspensión de eritrocitos y se añaden diluciones seriadas del suero problema. Las reacciones positivas se manifiestan como un sedimento plano y las negativas como una mancha abotonada en el centro del pocillo. Se ha demostrado que existen reacciones cruzadas, por ejemplo, con *H. parasuis* (Nielsen, 1985).

CONCLUSIÓN

En los últimos años se ha detectado el surgimiento de cepas que son mitad serotipo 1 y mitad serotipo 7 (Gottschalk, *et al.*, 2000), así como también Nielsen *et al.* (1996) han demostrado lo mismo con cepas que son mitad serotipo 2 y mitad serotipo 7 en Europa y, por último, ahora son 15 los serotipos (Blackall *et al.*, 2002).

Lo anterior recuerda el problema de las reacciones cruzadas en los test serológicos o inmunológicos, y aunque estos inconvenientes pueden ser superados por las técnicas moleculares, éstas aún son costosas y no aptas para usarlas rutinariamente por los veterinarios de campo.

Otro gran problema es la detección de animales enfermos subclínicos o portadores, en donde las técnicas moleculares podrían ser la gran solución; sin embargo, esta es una aseveración aún muy pretenciosa. Además es importante señalar que estas técnicas, por lo general, son especie-específicas, dificultando el diagnóstico de los diferentes serotipos en un país.

Por lo tanto es fundamental, a corto plazo, cultivar y aislar el o los serotipos de App presentes en Chile, luego verificar la especie y el serotipo a través de técnicas moleculares y serológicas, para finalmente realizar estudios epidemiológicos que permitan conocer la realidad nacional. Lo anterior con el objetivo de estandarizar la mejor técnica que nos permita detectar animales portadores, antes de su ingreso al plantel, controlando así una enfermedad que ha generado por mucho tiempo considerables pérdidas.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la colaboración de sus profesores guía doctores Manuel Quezada y Álvaro Ruiz. Además de la ayuda prestada por el doctor Esteban Ramírez, compañero del Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Mención Patología Animal y el doctor Frano Malinarich, alumno del Doctorado en Bioquímica.

REFERENCIAS

- ALCÁNTARA, T., S. MENDOZA, A. ALTAMIRANO, D. OLIVA, M. MENDOZA, C. ÁLVAREZ, R. TREJO, E. HERNÁNDEZ, D. TRUJILLO, N. SOTO, A. CIPRIÁN. 2004. Neumotest© and ELISA serological study in pigs vaccinated with a commercial bacterin against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. UNAM, México. 18th IPVS congress. Amburg, Germany.
- ANGEN, O. y S. JESSING. 2004. PCR tests for serotype specific identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Copenhagen, Denmark. 18th IPVS congress. Amburg, Germany.
- ARCHAMBAULT, M., J. LABRIE, C. RIOUX, F. DUMAS, P. THIBAUT, C. ELKINS, M. JACQUES. 2003. Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Can. J. of Vet. Res. Vol. 67: 271-277.
- BAEKBO, P. 2002. Respiratory diseases: Airborne transmission. Pig progress. Jun: 30-32.
- BÉLANGER, M., C. BEGIN, M. JACQUES. 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig Hemoglobin. Infec. Immun. Vol. 63(2): 656-662.
- BIBERSTEIN, E. y YUANG CHUNG ZEE. 1990. Tratado de microbiología veterinaria. Zaragoza, España. Editorial Acribia, S.A.
- BLACKALL, P., J. KLAASEN, H. VAN DER BOSCH, H. KUHNERT, P. FREY. (2002). Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. Vet. Microbiol. (84): 47-52.
- BURET, A., E. NERLAND, J. LEBLANC, D. MORCK, J. MERRILL, M. PARADIS, P. DICK. 2004. Pro-apoptotic and anti-inflammatory effects of oral tilmicosin in the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected porcine lung. A.A.S.V. (3): 135-138.
- BUSSO, J. y A. AMBROGI. 1990. Congreso Nacional de Producción Porcina. Depto. de Patología animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. U.N.R.C. Argentina.
- CARTER, G., M. CHENGAPPA, A. ROBERTS, G. CLAUS, Y. RIKIHISA. 1995. Essentials of Veterinary Microbiology. (5^a ed.). U.S.A. A Lea and Febiger book.
- CHIERS, K. 2003. Respiratory diseases: Contagious pleuropneumonia control. Pig Progress. Nov: 22-23. Netherlands.
- CHO, W., C. CHOI, C. CHAE. 2002. *In situ* hybridization for the detection of the *ApxIV* gene in the lungs of pigs experimentally infected with twelve *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. Vet. Res. (33): 653-660.
- CIPRIÁN, A., D. GONZÁLEZ, G. COLMENARES, C. CAMACHO, H. LARA, F. PARODI, T. ALCÁNTARA, S. JUVENAL, A. SÁNCHEZ, M. LÓPEZ, M. EZQUIVEL, D. RAMOS, D. MENDOZA, C. ÁLVAREZ, R. HERNÁNDEZ, D. OLIVA, C. RODRÍGUEZ, D. TRU-

- JILLO, A. VARGAS, M. TRUJILLO, E. HERNÁNDEZ, S. MENDOZA. 2004. The Schwartzman Sanarelli phenomenon in pigs that are Esther vaccinated or infected-vaccinated and challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*: I. Pathogenesis study. Microbiología veterinaria. UNAM, México. 18TH IPVS congress. Amburg, Germany.
- DEL RÍO, M., B. GUTIÉRREZ, C. GUTIÉRREZ, J. MONTER, E. RODRÍGUEZ. 2003. Evaluation of survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* in tour liquid media and two swab specimen transport systems. AJVR. Vol. 64(9): 1176-1180.
- DENEER, H. y A. POTTER. 1988. Effects of iron restriction on the outer membrane protein of *Actinobacillus (haemophilus) pleuropneumoniae*. Infec. Immun. Vol. 57(3): 798-804.
- DESROSIERS, R. 2000. Respiratory diseases: Talking pleuropneumonia. Pig progress. Jun: 10-11. Netherlands.
- DREYFUS, A., A. SCHALLER, S. NIVOLLET, R. SEGERS, M. KOBISCH, L. MIELI, V. SOERENSEN, D. HÜSSY, R. MISEREZ, W. ZIMMERMANN, F. INDERBITZIN, J. FREY. 2004. Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. Vet microbiol. 99: 227-238.
- ERIKSEN, J. 2004. Avoid transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in finisher pigs. Hobro, Denmark. 18TH IPVS congress. Amburg, Germany.
- FEY, H. 1978. Compendio de bacteriología general médica. Zaragoza, España. Editorial Acribia.
- FITTIPALDI, N., A. BROES, J. HAREL, M. KOBISCH, M. GOTTSCHALK. 2003. Evaluation and Field Validation of PCR Tests for Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically Infected Pigs. J. of Clin. Microbiol, Nov: 5085-5093.
- GOTTSCHALK, M. 1998. The diseases: *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Pig progress. Jun: 34-35.
- GOTTSCHALK, M., A. LEBRUN, S. LACOUTURE, J. HAREL, C. FORGET, K. MITTAL. (2000). Atypical *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates that share antigenic determinants with both serotypes 1 and 7. J. Vet. Diagn. Invest. 12. 444-449.
- GOTTSCHALK, M., A. BROES, N. FITTIPALDI. 2004. Recent Developments on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. Université de Montréal, Québec, Canadá. www.expol.com/general/circulares/184html.
- GUNNARSSON, A. 1979. Evaluation of different antigens in the complement-fixation test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae (parahaemolyticus)* infections in swine. Am. J. Vet. Res. 40: 1564.
- GUNNARSSON, A., B. HARREL, E. BIBERSTEIN. 1978. Serologic studies of porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: antigenic specificity and relationship between serotypes. Am. J. Vet. Res. 39: 1286-1292.
- GUTIÉRREZ, M., R. TASCÓN, J. RODRÍGUEZ, E. RODRÍGUEZ. 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Depto de Patología animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. España.
- HAESEBROUCK, F., K. CHIERS, I. VAN OVERBEKE, R. DUCATELLE. 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. Vet. Microb. 58: 239-249.
- HENNING-PAUKA, I., I. JACOBSON, K. WALDMANN, G. GERLACH. 2004. Increase of antibacterial peptides in porcine lung after an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. School of Veterinary Medicine. Hannover, Germany. 18TH IPVS congress. Amburg, Germany.
- HERNÁNDEZ, R., G. CHÁVEZ, J. GUTIÉRREZ. 2002. Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, biotipo 1, serotipo 1 de pulmones de cerdos con y sin lesiones neumónicas, utilizando la técnica de inmunohistoquímica. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México. 18TH IPVS congress. Amburg, Germany.
- HUERTA, O., D. HERRERA, N. GONZÁLEZ, M. ARRIETA. 2004. Results of the usage of a bacteria against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in hog farm in central region in Mexico. Investigación aplicada. Puebla, México. 18TH IPVS congress. Amburg, Germany.
- IGLESIAS, G. 2000. Health: *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Latin America. Pig progress. Jun. Vol. 16 (6). Netherlands.
- INZANA, T. y B. FENWICK. 2001. Serologic Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Swine by Capsular Polysaccharide-Biotin-Streptavidin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. Microbiol. April. Vol. 39 (4): 1279-1282.
- JANEWAY, C., P. TRAVERS, M. WALPORT, J. CAPRA. 2000. Inmunobiología: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. (4ª ed.). Barcelona, España. Masson S. A.
- KIM, H., K. JEONG, J. HAN. 2004. Evaluation of vaccination against *A. Pleuropneumoniae* by different vaccination timepoints in non antibiotics using herd. Chuncheon, Korea. 18TH IPVS congress. Amburg, Germany.
- LAVAL, A. 2000. Controlling respiratory infections: where are we? Pig progress. Vol. 16 (10): 9-11.
- LEMAN, D., B. STRAW, W. MENGELING, S. D'ALLAIRE, D. TAYLOR. 1994. Diseases of swine. (7ª ed.). Franklin, Kentucky, USA. Printed on acid-free paper.
- MAES, D., K. CHIERS, F. HAESEBROUCK, H. LAESENS, M. VERDONCK, A. DE KRUIF. 2001. Herd factors associated with the seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. Vet. Res. Vol. 32: 409-419.
- MALDONADO, J., P. RIERA, E. MARTÍNEZ, D. LLOPART, C. OSORIO, C. ARTIGAS. 2004. Nad-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* implicated in the etiology of fatal swine Pleuroneumonía. Universidad Santiago de Compostela. Santiago, España. 18TH IPVS congress. Amburg, Germany.
- MARSTELLER, T. y B. FENWICK. 1999. *Actinobacillus pleuropneumoniae* diseases and serology. Swine health and production. Vol. 7 (4): 161-165.
- MOSER, R., A. REVERTER, C. KERR, K. BEH, S. LEHNERT. 2004. A mixed-model approach for the analysis of cDNA microarray gene expression data from extreme-performing pigs after infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Anim. Sci. Vol. 82: 1261-1271.
- NIELSEN, R. 1985. *Haemophilus pleuropneumoniae*: Diagnosis, immunity and control. En: Schultz, R.A. ed. *Haemophilus pleuropneumoniae Compendium*. Biotech Corporation SDS. Avoca, Iowa: 18.
- NIELSEN, R., ANDRENSSEN, L. PLAMBECK. (1996). Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1 strains antigenically related to both serotypes 2 and 7. Acta. Vet. Scand. 37: 327-336.
- ÓRDENES, G., C. LEIVA, M. MÜLLER. 2004. Curso de Inmunohistoquímica Básica y Avanzada con Aplicación en Investigación y Patología. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- O'REILLY, T. y D. NIVEN. 2002. "Levels of nicotinamide adenine dinucleotide in extracellular body fluids of pigs may be

- growth-limiting for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*". Can. J. Vet. Res. 67: 229-231.
- QUINN, P., B. MARKEY, M. CARTER, W. DONNELLY, F. LEONARD, D. MAGUIRE. 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. Bodmi, Cornwall. U.K. MPG Books Ltd.
- RODRÍGUEZ, E. 2001. "Caracterización y prevalencia de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en España". Lorca, España. Anapor publicaciones.
- ROITT, I., J. BROSTOFF, D. MALE. 1993. Inmunología. (3ª ed.). Barcelona, España. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A.
- ROSENDAL, S., CARPENTER, D. MITCHELL, M. WILSON. 1981. Vaccination against pleuropneumonia of pigs caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. Can. Vet. J. 22: 34.
- RYCROFT, A. 1999. Respiratory diseases: Mimicking immunity to prevent pleuropneumonia. Pig progress. (6): 16-18.
- SANFORD, E. 1998. *Actinobacillus pleuropneumoniae* Pneumonia and *A. suis*: an update. A. A. S. P. 357-359.
- SCHALLER, A., J. WIT, A. ROSSI. 2004. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with complement fixation test for the detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Animal health services. Deventer, The Netherlands. 18TH IPVS congress. Amburg, Germany.
- SHIN, S., J. BAE, Y. CHO, M. YANG, D. KIM, Y. JANG, H. YOO. 2003. Expression of *apxIA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in *Saccharomyces cerevisiae*. Sci. Vol. 4(3): 225-228.
- STRAW, B., D. TAYLOR, S. D'ALLAIRE, W. MENGELING. 2000. Enfermedades del cerdo (8ª ed.). Bs. As., República Argentina. Editorial Interamericana.
- TORREMORELL, M., C. PIJOAN, K. JANNI, R. WALKER, H. SOO JOO. 1997. Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. AJVR. Vol. 58(8): 828-831.
- VADILLO, S., S. PÍRIZ, E. MATEOS. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. Madrid, España. Edigrafos, S. A.
- WALLGREN, P., M. SJÖLUND, M. PERSSON, M. ZORIC, G. KARLSSON. 2004. Spread of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* in a pig herd chronically affected by respiratory disorders. Uppsala, Sweden. 18TH IPVS congress. Amburg, Germany.
- WANG, F., J. YANG, S. HUNG, I. PAN. 2001. In vitro migratory responses of swine neutrophils to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Exp. Anim. Vol. 50(2): 139-145.
- WILLIAMS, J., M. SALAZAR, R. RAMÍREZ, Z. MOSQUEDA-ARA. 2001. Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida* tipo "A" ante diferentes antimicrobianos. Rev. Biomed. Vol. 11(3): 175-181.
- WOOLCOCK, J. 1991. Microbiology of Animals and Animal products. Amsterdam, The Netherlands. Elsevier Science publishers B.V.