

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

EAP. DE MEDICINA VETERINARIA

**Persistencia de la inmunidad pasiva contra
actinobacillus pleuropneumoniae en porcinos en etapa
de recría**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Omar Ricardo GARCÍA PARREÑO

ASESOR

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA

Lima - Perú

2007

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	vi
RESUMEN	viii
SUMMARY	ix
LISTA DE TABLAS Y GRAFICOS	x
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Etiología.....	3
2.2.1 Factores de virulencia	5
2.3 Epidemiología	7
2.3.1 Agente	7
2.3.2 Distribución	7
2.3.3 Fuentes de infección	9
2.3.4 Modo de transmisión	10
2.3.5 Factores predisponentes	10
2.3.6 Hospedero	11
2.4 Patogenia, signos clínicos y lesiones .	12
2.4.1 Patogenia.....	12
2.4.2 Signos clínicos y lesiones	15
2.5 Respuesta Inmune e Inmunidad pasiva	16
2.6 Diagnóstico ..	20
2.6.1 Diagnóstico bacteriológico	21
2.6.2 Diagnóstico serológico ...	23
2.6.2.1 Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas (ELISA)	23
2.6.3 Diagnóstico por PCR .	25
2.7 Control y Prevención	27
2.7.1 Erradicación	28
2.7.2 Vacunación	29
2.8 Tratamiento	32

III. MATERIALES Y METODOS	31
3.1 Lugar de estudio	31
3.2 Sistema de manejo de la granja	31
3.3 Animales y diseño de estudio	32
3.4 Materiales para la toma de muestra	33
3.5 Materiales y equipo de laboratorio	33
3.6 Obtención de muestras	33
3.7 Procesamiento de muestras	34
3.7.1 Preparación de los reactivos	34
3.7.2 Dilución, distribución e incubación de las muestras y controles.....	35
3.7.3 Lavado de las placas de microtitulación	35
3.7.4 Dilución, distribución e incubación del conjugado	35
3.7.5 Adición del sustrato TMB cromógeno	35
3.7.6 Lectura e interpretación de los resultados	36
3.8 Análisis de datos	36
IV. RESULTADOS	37
V. DISCUSION	42
VI. CONCLUSIONES	48
VII. RECOMENDACIONES	49
VII. LITERATURA CITADA	50
VIII APENDICES	61

RESUMEN

En el presente estudio se observó la persistencia de la inmunidad pasiva en porcinos procedentes de madres seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae* hasta el final del período de recría en una granja tecnificada de Ica. Se utilizaron para este estudio 30 lechones los cuales fueron muestreados a los 17, 42 y 73 días, el cual corresponde al período de destete, mitad y final del período de recría respectivamente. Las muestras de suero fueron analizadas por medio de una prueba de ELISA indirecto que detecta anticuerpos contra la toxina ApxIV, presente en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae*, siendo ésta específica de especie. Al final de la etapa de lactación, estos animales presentaron desuniformidad en los niveles de anticuerpos, descendiendo estos niveles conforme avanzaba la edad. Al final de la fase de recría, la media del nivel de concentración de anticuerpos, expresado como el cociente de densidad óptica, resultó en 0.38, el cual indica que estos animales llegan al final de ésta etapa con niveles mínimos de anticuerpos, pudiéndose volver susceptibles al ingreso de la etapa de engorde, sumado esto a factores ambientales y de estrés comunes durante ésta etapa.

Palabras clave: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, inmunidad pasiva, recría, ELISA

SUMMARY

In the present study we observed the persistence of passive immunity in pigs from seropositive dams to *Actinobacillus pleuropneumoniae* until the end of the rebreeding period on a farm tech Ica. We used for this study 30 piglets which were sampled at the 17, 42 and 73 days, which corresponds to the period of weaning, middle and end of rebreeding period respectively. Serum samples were analyzed by means of an indirect ELISA test that detects antibodies to the toxin ApxIV, present in all serotype *A. pleuropneumoniae*, as this specific kind. At the end of the stage of lactation, these animals showed desuniformity in antibody levels down these levels under the age progressed. At the end of the rebreeding stage, the mean of level of antibody concentration, expressed as the ratio of optical density, resulting in 0.38, which indicates that these animals arrive at the end of this stage with minimum levels of antibodies, can be susceptible to re income from the stage of fattening, added this to environmental factors and stress common during this stage.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, passive immunity, rebreeding, ELISA

LISTA DE CUADROS Y GRAFICOS

Cuadro 1. Valores obtenidos y analizados de los cocientes de DO para los anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos a los distintos días de muestreo. Pág. 42

Cuadro 2. Valores obtenidos y analizados de los cocientes de DO para los anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos a los distintos días de muestreo después de su transformación logarítmica. Pág. 42

Gráfico 1. Tendencia de los anticuerpos maternos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos en cada día de muestreo. Pág. 43

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente se tiene conocimiento que los problemas respiratorios que afectan a los porcinos repercuten de manera directa con la rentabilidad de la explotación, ya sea por la disminución de la producción, por muerte, o por los costos derivados de la medicación y servicios veterinarios, así como la introducción de sistemas de manejo que faciliten su control (Thacker, 1997).

Dentro de los problemas que afectan al sistema respiratorio porcino, se encuentran distintas especies bacterianas así como virus, ya sea de forma independiente o en forma asociada formando verdaderos complejos respiratorios. Esto, aunado a deficiencias en el manejo y bioseguridad, favorecen la mayor expresión de estos microorganismos trayendo consigo consecuencias fatales (Rodríguez Ferri, 2002).

Entre las especies bacterianas que se encuentran involucradas en estos procesos respiratorios tenemos al *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus somnus*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella cholerasuis*, *Streptococcus suis*, y al *Actinobacillus pleuropneumoniae* y otros como el *Mycoplasma hyopneumoniae* (Piffer y Feitosa, 1993).

El *Actinobacillus pleuropneumoniae* es el agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP), una enfermedad que se encuentra distribuida por todo el mundo y que produce importantes pérdidas económicas (Coelho *et al.*, 2004); siendo altamente contagiosa, y su presentación va desde una forma sobreaguda hasta una

crónica, causando signos respiratorios característicos y, en algunos casos, mortalidad elevada (Rosales, 2005).

Muchas veces esta enfermedad no siempre se encuentra sola en las explotaciones, debiendo diferenciarse de otros procesos respiratorios que afectan al pulmón. Muy a menudo el problema reside cuando varios de estos procesos se presentan en forma simultánea con cuadros polimicrobianos complejos, entre los que tienen lugar numerosas interacciones, incluyendo varios tipos de virus (Rodríguez Ferri, 2002).

Esta enfermedad puede afectar a cerdos de cualquier edad, siendo los de mayor frecuencia a partir de las 8 semanas de edad debido a factores estresantes, cambios en el manejo y pérdida de la inmunidad pasiva materna (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a).

La serología es muy importante para la evaluación de la presencia de algún serotipo patógeno presente, confirmación de una infección crónica, estudio de la cinética de anticuerpos, identificación de maternidades infectadas y la verificación de la respuesta de anticuerpos frente a una vacunación (Gottschalk, 2004).

En el Perú se ha demostrado la presencia del *Actinobacillus pleuropneumoniae* a través del aislamiento y la serología; determinándose que los serotipos 1, 3, 5 y 7 son los que se encuentran presentes, no descartándose la presencia de otros serotipos (Calle *et al.*, 1996; Castillo, 1996). Sin embargo es poco lo que se conoce de esta enfermedad en nuestro país.

El objetivo del presente trabajo fue el de determinar, mediante serología, la cinética de los anticuerpos colostrales contra el *Actinobacillus pleuropneumoniae* en lechones desde la fase de destete hasta el final de la etapa de recría en un sistema de producción porcina multisitios en el Perú. Los resultados de este estudio podrían ser utilizados para la elaboración de estrategias de control y prevención de la enfermedad para la granja, así como para desarrollar un manejo adecuado de los lechones minimizando el riesgo de exposición a este agente.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

El *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) anteriormente fue conocido con los nombres de *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus parahaemolyticus* y de *Haemophilus pleuropneumoniae*. Fue aislado por primera vez por Pattison en los Estados Unidos en 1957; y posteriormente por Shope, en Argentina, en 1964 (Rycroft *et al.*, 2000) donde observó que un grupo de animales presentaban disturbios respiratorios severos, conllevando a la muerte a las 24-48 horas después del inicio de los signos clínicos (Vaz, 2002).

Ya en la década de los 70, emergió como una enfermedad respiratoria bacteriana preocupante a los productores y médicos veterinarios (Vaz, 2002). Posteriormente, en 1983, a través de estudios de homología del ADN, se demostró la estrecha relación con el *Actinobacillus ligneriensisii*, pasándose a incluir esta especie al género *Actinobacillus* de la familia *Pasteurellaceae* (Pohl, 1983).

2.2. Etiología

Esta bacteria es un cocobacilo pleomórfico, pequeño (0.4-1.0 μ m), gramnegativa, anaerobio facultativo, capsulado y no esporulado (Rodríguez Ferri, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2002). Se ha descrito la presencia de flagelos, observándose movilidad *in vitro* (Negrete-Abascal *et al.*, 2002).

La mayoría de sus cepas necesita para su crecimiento el piridin nucleótido (factor sanguíneo V de la coagulación) o nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Esta dependencia de NAD permite diferenciarlos en dos biotipos. El biotipo I, dependiente de NAD que comprende 13 serotipos en total, englobando en ella a las cepas más virulentas; y el biotipo II, que posee cepas independientes de NAD, poseyendo el *A. pleuropneumoniae* en total 15 serotipos conocidos (Blackall *et al.*, 2002; Rodríguez Ferri, 2002; Utrera *et al.* 2006). Anteriormente se pensaba que el biotipo II no estaba implicado en casos de enfermedad, pero estudios recientes han demostrado la posibilidad de estar implicado en brotes de PCP y colonizando animales que pueden actuar como portadores (Maldonado *et al.*, 2004).

La determinación del serotipo se basa en los polisacáridos capsulares (antígeno K) y los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa (antígeno O) (Gottschalk *et al.*, 2005). El antígeno O del LPS, inmunodominante, causa reacciones cruzadas que originan problemas en la tipificación, especialmente muy evidentes en el caso de los serotipos 1, 9 y 11; 3, 6, 8 y 15; y 4 y 7 (Radostis *et al.*, 2002; Rosales, 2005). Los serotipos 1, 3, 5, 9, 10 y 11 son los que provocan patologías más graves.

Este microorganismo utiliza los carbohidratos con producción de ácido y se pueden definir como exigentes en su crecimiento (Gutiérrez *et al.*, 2002). La temperatura óptima de crecimiento es a 37°C, preferiblemente en presencia de CO₂ (5%), al menos en los cultivos iniciales. Crece bien en agar chocolate, agar PPLO y agar sangre, este último suplementado con un 0.025% de NAD o mediante inoculación de una estricta nodriza de *Staphylococcus aureus* o *St. intermedius* que produce NAD y permiten un crecimiento satélite (Gutiérrez *et al.*, 2002; Rodríguez Ferri, 2002).

Las colonias al cabo de 24 a 48 horas son pequeñas, redondas, opacas o brillantes, de color gris y con un olor característico. El agar PPLO enriquecidas con extracto fresco de levaduras al 10%, suero de caballo al 5%, glucosa al 0.1% y NAD al 0.025-0.07%, permiten el crecimiento precoz, incluso al cabo de 6 horas con una capsula bien desarrollada, cuya presencia produce iridiscencia característica cuando la placa se observa a la luz solar (Rodríguez Ferri, 2002).

2.2.1 Factores de virulencia

La **cápsula** es el componente principal para la protección bacteriana parcial contra la fagocitosis y la lisis mediada por el complemento. El grado de desarrollo de la cápsula varía según los serotipos, siendo los serotipos 1, 3 y 5 las que la poseen bien definida, mientras que los serotipos 2 y 7 apenas se identifica (Dubreuil *et al.*, 2000; Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a). Los anticuerpos formados contra ella opsonizan la bacteria evitando la mortalidad en infecciones experimentales, pero no impidiendo el desarrollo de lesiones pulmonares ni resolviendo su cronicidad (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002b).

Los **lipopolisacáridos** (LPS) poseen carácter de endotoxina y pueden jugar un rol importante en la adherencia bacteriana al tracto respiratorio, debido a que mutantes sin ella pierden tal propiedad (Jacques, 2004). Se ha demostrado que en la enfermedad natural existe sinergismo entre el LPS y las toxinas Apx, no observándose en casos experimentales lesiones características de la enfermedad, aunque sí se determinó la adherencia de *A. pleuropneumoniae* al mucus y a los anillos traqueales y, por lo tanto, desempeña un papel importante en la colonización. Es importante en la respuesta inflamatoria ya que induce la producción de citoquinas tales como TNF α , IL-1, IL-8 e IL-8 (Dubreuil *et al.*, 2000; Rodríguez Ferri *et al.*, 2002b).

Las **proteínas de membrana externa** (OMP) son moléculas localizadas en la membrana externa de la célula bacteriana. Se ha observado que los sueros de animales convalecientes reconocen diversas OMP favoreciendo su opsonización. La inmunización con un extracto crudo de membranas externas confiere una protección limitada frente al desafío con *A. pleuropneumoniae* (Beudet *et al.*, 1994). En este grupo se incluyen a los receptores de unión a la transferrina (tbpA y tbpB) y otras que participan de la virulencia (Jacques, 2004).

Las **exotoxinas** son proteínas con actividad tóxica que se secretan durante el proceso infeccioso, siendo fuertemente inmunógenas y poseyendo actividad hemolítica y/o citotóxica (Schaller *et al.*, 2000). El *A. pleuropneumoniae* posee cuatro exotoxinas, las cuales la mayoría son formadoras de poros. Su toxicidad se dirige contra eritrocitos, macrófagos alveolares y neutrófilos, provocando choque osmótico que conduce a la

muerte celular. Estas son codificadas por un conjunto de cuatro genes *apxACBD* dispuestos en tandem en un operón. Todos los serotipos codifican al menos 2 exotoxinas como mínimo.

El **Apx I**, es una proteína con fuerte actividad hemolítica y citotóxica, y es secretada por la mayoría de serotipos virulentos (1, 5, 9, 10 y 11). El **ApxII** es una proteína que presenta moderada actividad hemolítica y citotóxica, y es expresada por todos los serotipos excepto por los serotipos 10 y 14. El **ApxIII**, es una proteína que posee fuerte actividad citotóxica pero no posee actividad hemolítica, siendo secretada por los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8 (Huang *et al.*, 2006; Frey, 1995). El **ApxIV**, descubierta recientemente, es una proteína que posee una función aun no determinada, excepto que el ApxIV recombinante producido en *E. coli* mostró una actividad hemolítica débil, así como se observó sinergismo con la toxina β del *Staphylococcus aureus* (Schaller *et al.*, 1999). Además se sugiere que el ApxIV puede aumentar el daño tisular por medio de la lisis de células inflamatorias, así como contribuir con el crecimiento bacteriano aumentando así su virulencia (Cho y Chae, 2001a). Esta toxina no se expresa en cultivos *in vitro* de *A. pleuropneumoniae* (solo *in vivo*), y está presente en todos los serotipos siendo específica de especie (Schaller *et al.*, 1999; Cho y Chae, 2001b). Cepas del biotipo 2 producen solamente la toxina ApxII *in vivo* e *in vitro* (Vaz, 2002).

Entre otros factores de virulencia se encuentran las **fimbrias**, que podrían ser fundamentales para su adhesión al epitelio respiratorio (Utrera y Pijoan, 1991), desapareciendo con los primeros pases *in vitro*. Las **proteasas** son capaces de degradar la gelatina porcina, las IgA y la hemoglobina. Esta última acción podría ser importante para la colonización de las mucosas y la obtención de hierro combinado en esta proteína plasmática. Las proteasas son secretadas al medio englobadas en vesículas que contienen también exotoxinas (Negrete-Abascal *et al.*, 2000). También se mencionan a la **ureasa** cuyo rol en la patogénesis parece que tiene lugar a largo plazo mediante la intervención de la respuesta inmune local, lo que le permite mejorar la persistencia. Las **superoxidodismutasas** (SOD) están implicadas en la defensa celular frente al daño oxidativo incluyendo 3 tipos dependientes de sus factores: de Mn, de Fe y de Cu/Zn-SOD, facilitando su supervivencia bacteriana local dismutando el superóxido generado por las células inflamatorias (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a).

2.3. Epidemiología

2.3.1 Agente

Esta bacteria se localiza en las tonsilas, abscesos y en los nódulos linfáticos pulmonares de los porcinos, transformándolos en portadores asintomáticos (Bersano *et al.*, 2003).

La supervivencia de esta bacteria en el medio ambiente es limitada, sabiéndose que sobrevive por 5 días a 18°C en descargas nasales mucopurulentas, pocas horas en desecación, 30 días en agua limpia a 4°C, semanas en lesiones pulmonares y al menos 4 a 6 meses en tonsilas (Palomo, 2006). En el laboratorio la situación es similar, puesto que en los medios de cultivo las bacterias no sobreviven más de una semana, y su viabilidad se mantiene mejor a temperatura ambiente que en refrigeración (Gutiérrez *et al.*, 2002), independientemente de la suplementación o no con NAD. Su supervivencia en el suero a temperatura ambiente es de 12 días, pudiéndose duplicar en el caso de suplementar el medio con NAD o bajando la temperatura a 4°C. Resulta adecuada para su conservación prolongada la utilización de temperaturas de -80°C en un medio de conservación que incluye leche descremada y glicerina, al igual que la liofilización (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a).

A. pleuropneumoniae es destruido por la mayoría de los desinfectantes, especialmente los formaldehídos, glutaraldehidos, etanol, isopropilenos y clorhexidina; aunque la materia orgánica resulta un inhibidor común. Tampoco resiste el calor (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a; Palomo, 2006).

2.3.2 Distribución

La PCP tiene una distribución mundial y se ha convertido en un problema importante conforme la producción es más intensiva y tecnificada. En la década pasada se tenían geográficamente bien definidas las áreas donde eran más prevalentes algunos serotipos, sin embargo debido al aumento del comercio internacional y la movilización de

animales, esa diferenciación ha ido disminuyendo por lo que actualmente los 15 serotipos se pueden encontrar prácticamente en cualquier lugar (Rosales, 2005).

La mayoría de los rebaños de los países productores de cerdos está endémicamente infectados por *A. pleuropneumoniae*, presentándose serológicamente positiva, pero sin demostrar signos clínicos de la enfermedad. Estos animales pueden estar infectados por cepas menos virulentas o las condiciones de manejo del rebaño son adecuadas e impiden la manifestación de la enfermedad. Algunos rebaños pueden ser serológicamente negativos, sin evidencia de enfermedad clínica, siendo considerablemente más vulnerables, tornando a las medidas de bioseguridad como algo fundamental (Vaz, 2002).

Los serotipos más frecuentes en Norteamérica son el 1, 5 y 7, en Europa continental los serotipos 2 y 9, en Inglaterra el serotipo 3, en Canadá los serotipos 1, 2, 5, 7 y 12, y en España los serotipos 1, 2, 4, 7, 9 y 11. En Australia además de los serotipos 1, 2, 3, 5 y 7, se descubrió el nuevo serotipo 15 (Schaller *et al.*, 1999; Radostis *et al.*, 2002). En lo que respecta a Sudamérica, en Brasil los más prevalentes son los serotipos 3, 5 y 7 (Machado *et al.*, 2001), en Argentina los serotipos 1, 5, 7 y 12 (Zielinski, 2006) y en Venezuela los serotipos 1, 2, 5 y 7 (Utrera *et al.*, 1988).

En el Perú se realizaron estudios para determinar la seropositividad a la PCP en animales aparentemente sanos con antecedentes neumónicos donde se hallaron los serotipos 1, 3, 5 y 7, siendo el serotipo 3 el que presentó la mayor frecuencia, no descartándose la presencia de otros serotipos (Calle *et al.*, 1996). Esta probado que en una misma granja pueden actuar diversos serotipos, con diverso grado de patogenicidad, complicando el cuadro inmunológico (Chiers *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista epidemiológico, las granjas pueden clasificarse en categorías según la forma como se presenta el *A. pleuropneumoniae*. Dentro de la categoría 1 se encuentran las granjas con serología positiva y sin casos clínicos, categoría 2 los que presentan serología negativa y sin casos clínicos, y la categoría 3 con serología positiva y sin presencia clínica (Martseller, 1999).

2.3.3 Fuentes de infección

Las principales fuentes de infección son los animales con infección crónica y los portadores asintomáticos, en los que los microorganismos sobreviven en la cavidad nasal, tonsilas o en las lesiones pulmonares y representan la principal fuente de infección de cerdos susceptibles sin exposición previa de la enfermedad. Estos cerdos son una fuente de infección, especialmente en rebaños de engorde que adquieren animales de diferentes procedencias (Radostis *et al.*, 2002; Vaz, 2002).

La fuente de infección más importante para los cerdos jóvenes durante la lactancia son las madres portadoras subclínicamente, ya que éstas eliminan la bacteria presentes a nivel tonsilar, colonizando el tracto respiratorio de los lechones durante las primeras semanas de edad (Chiers *et al.*, 2002; Vigre *et al.*, 2002). Estas madres pueden albergar más de un serotipo a este nivel, siendo muchas veces no detectado por pruebas serológicas convencionales (Angen y Jessing, 2004). Debido a esta infección en maternidad, una proporción de cerdos pueden quedar como portadores permitiendo que el *A. pleuropneumoniae* se mantenga en la granja.

La entrada de cerdas de reemplazo es uno de los puntos clave de la transmisión de la infección. Se piensa que los lechones que nacen de estos animales son excretores de la bacteria en número mayor que los que provienen de hembras más viejas. El reagrupamiento de lechones provenientes de diferentes maternidades, de las cuales al menos una está infectada, es muchas veces suficiente para provocar la eclosión de la enfermedad. En los sistemas de rotación, la fuente de infección son las madres que infectan verticalmente a los lechones (Gottschalk, 2004).

En el engorde, la introducción constante de animales infectados estimula constantemente la infección. Una vez establecida la infección en el engorde, mismo si los lechones que entran del destete no están infectados, los animales de más edad portadores mantendrán la infección activa (Gottschalk, 2004).

Muchas veces, posteriormente a la infección aguda, se establece un carácter crónico y enzoótico de la enfermedad, cuya baja y constante exposición inducen inmunidad al

rebaño, restringiendo una nueva infección. La introducción de un nuevo serotipo de *A. pleuropneumoniae* en rebaños crónicamente infectados normalmente resulta en baja morbilidad, siendo los anticuerpos detectados solamente en cerdos cuya nueva cepa haya sido capaz de colonizar el tejido pulmonar. La ocurrencia de casos de enfermedad es remota en rebaños infectados en forma endémica, donde la mayoría de los animales tienen un alto título de anticuerpos naturalmente inducidos, así como en granjas donde las prácticas de manejo y las condiciones ambientales son adecuadas y los porcinos son libres de otras enfermedades (Vaz, 2002).

La inmunidad de base poblacional serotipo-específico que se establece a nivel de granja luego de sucesivos brotes de enfermedad, puede desestabilizarse por la aparición en el medio de serotipos heterólogos que generalmente entran en la granja a través de la adquisición de animales portadores subclínicos (Zielinski, 2006).

2.3.4 Modo de transmisión

La principal forma de transmisión es la vía respiratoria (Radostis *et al.*, 2002), ocurriendo la transmisión por el contacto directo entre los animales, lo que también es posible a través de aerosoles a distancias cortas (Vaz, 2002). El contacto directo nariz con nariz constituye el modo más importante de transmisión de la infección (Utrera *et al.*, 2006). El modo de transmisión aéreo no parece ser una manera común de contagio, ya que se demostró que la transmisión aérea era posible solo a través del aerosol a una distancia de por lo menos 2.5 metros dentro de las 2 semanas (Jobert *et al.*, 2000).

Pájaros, roedores y personas no son buenos vectores para la transmisión. Tampoco se ha podido demostrar por inseminación artificial o por transferencia de embriones (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a)

2.3.5 Factores Predisponentes

El desarrollo de la enfermedad clínica depende de varios factores, desde la virulencia del agente, el número de organismos presentes en el ambiente, la susceptibilidad

inmunológica de los animales, incluyendo las condiciones de confinamiento (Vaz, 2002).

Generalmente la infección por *A. pleuropneumoniae* es subclínica hasta que una situación de estrés resulta en la aparición de brotes. Del mismo modo, cambios climáticos bruscos con frecuencia representan el factor predisponente de los brotes, así como hacinamiento, transporte, pobres condiciones sanitarias, sistemas de producción de flujo continuo, pobre ventilación, humedad elevada y variaciones extremas de temperatura a lo largo del día. La severidad de la enfermedad esta correlacionada con el nivel de inmunidad del rebaño afectado (Utrera y Del Castillo, 2006). Los signos clínicos pueden ser exacerbados por infecciones anteriores o concomitantes, generalmente causados por *Mycoplasma spp*, *Salmonella spp*, *Pasteurella spp* y el virus de la enfermedad de Aujeszki, entre otros, demostrando que una enfermedad clínicamente significativa difícilmente esta asociado a infecciones causadas por un único patógeno (Vaz, 2002); sin embargo esto no ha sido observado en infecciones experimentales con el virus del PRRS (Chiers, 2004).

2.3.6 Hospedero

El hospedero natural del *A. pleuropneumoniae* es el cerdo, aunque ha sido aislado ocasionalmente de otras especies animales (Gottschalk, 2004); esto debido, posiblemente, a la capacidad del agente en obtener hierro solo de la transferrina porcina y por factores específicos de adherencia (Vaz, 2002)

Todos los cerdos son susceptibles, sin embargo, los que están mantenidos en flujos de alta densidad, en ambientes cerrados, con inmunidad materna escasa y con estrés, tienen mayor susceptibilidad. Es por eso que la edad en el que son más comunes los casos clínicos es entre las 12 y 18 semanas, como consecuencia del cambio de sitio, reagrupación, pérdida de inmunidad materna, excreción del agente de los afectados y contagio de los susceptibles por contacto y aerosoles (Rosales, 2005). La enfermedad se propaga rápidamente dentro del lote que primero se ha infectado y a continuación a otros cerdos de mayor edad o más jóvenes dentro del mismo rebaño. La tasa de

morbilidad puede superar el 50% y la mortalidad puede variar entre el 1 y el 10% (Radostis *et al.*, 2002).

2.4 Patogenia, signos clínicos y lesiones

2.4.1. Patogenia

La infección normalmente ocurre a través de la vía aérea a distancias cortas o por contacto directo, donde ingresa a las vías respiratorias superiores y/o cavidad nasal para adherirse al epitelio tonsilar produciendo inflamación de la misma y a partir de ahí se disemina a las células ciliadas de los bronquiolos terminales y el epitelio alveolar, no uniéndose bien a los cilios del epitelio de la traquea o bronquio. En muchos casos, las partículas de aerosol producidas por el estornudo son lo suficientemente pequeñas para penetrar el tracto respiratorio bajo, obviando colonizar el tracto respiratorio superior (Bossé *et al.*, 2002). El *A. pleuropneumoniae* fue encontrado asociado a la superficie del epitelio tonsilar 30 minutos después de su inoculación, sugiriendo que esta unión es probablemente el primer paso para la colonización del tracto respiratorio (Vaz, 2002). *A. pleuropneumoniae* es capaz de unirse *in vitro* a fosfolípidos presentes en las membranas celulares. El antígeno O del LPS está implicado en tal adherencia ya que anticuerpos monoclonales dirigidos contra ese antígeno inhiben tal unión (Jeannotte *et al.*, 2003). La presencia de fimbrias también debe jugar un papel en la adherencia de la bacteria a las superficies mucosas (Utrera y Pijoan, 1991). También una OMP ha sido descubierta, poseyendo un alto grado de adhesión al epitelio alveolar (Chiers, 2004). Posteriormente, el establecimiento de la infección depende de la habilidad de la bacteria de adquirir todos los nutrientes esenciales para su crecimiento (Bosse *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que el *A. pleuropneumoniae* tiene la capacidad de formar biofilms en medio de cultivo sólido, propiedad que pierde después de uno o dos pasajes *in vitro*. La propiedad fenotípica de formar biofilms pudiera ser un factor importante para la colonización, virulencia y transmisión del agente (Kaplan y Mulks, 2005).

Las bacterias en el biofilm son rodeadas por una matriz sintetizada por ellas mismas que mantiene las células agrupadas en una masa y las adhiere firmemente a las

superficies subyacentes. Dicha matriz es de naturaleza polisacárida (Costerton *et al.*, 1999). Esta matriz aparte de garantizar un microambiente protegido a las células, contiene nutrientes disueltos y enzimas secretadas, pudiendo ser responsable de la resistencia a ciertos antibióticos así como también a las defensas del hospedador.

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 (Hammer-Barrera *et al.*, 2004).

En brotes agudos, las descargas nasales pueden poseer más de 10^9 bacterias/ml de moco (Chiers, 2004). El contacto vía aerosol de 10^4 bacterias/ml (10^2 en serotipos más patógenos) son suficientes para causar la enfermedad. Normalmente están involucrados más de un serotipo habiéndose descrito hasta 6 en un solo cuadro clínico de granja (Palomo, 2006). La cantidad de bacterias en los pulmones es generalmente mayor que los que hay en la traquea o cornetes nasales, y su multiplicación en el parénquima pulmonar parece ser determinante para el surgimiento de la enfermedad clínica (Vaz, 2002).

Una vez en el pulmón, la bacteria es fagocitada rápidamente por los macrófagos alveolares; estas pueden sobrevivir por más de 90 minutos dentro de ellas (Chiers, 2004). Cuando la concentración de bacterias que alcanza el pulmón es muy elevada, supera la capacidad fagocítica de los macrófagos, observándose bacterias adheridas a la superficie de las células fagocíticas desde donde comienza la secreción de las toxinas formadoras de poros ApxI, Apx II, Apx III y/o Apx IV. Dichas toxinas poseen efecto tóxico sobre los macrófagos alveolares, células endoteliales y células epiteliales alveolares, siendo la Apx III de particular efecto tóxico contra macrófagos alveolares (Utrera y Del Castillo, 2006), donde después de 30 a 60 minutos son eliminadas y reducen la eficacia fagocitaria de los neutrófilos. Estas toxinas, que se producen durante la fase de crecimiento bacteriano, pueden determinar lesiones a las 3 horas post infección en casos sobreagudos y en 6 horas en los casos agudos (Palomo, 2006).

La cápsula actúa como mecanismo de protección contra las células fagocíticas además de ser resistente al efecto del complemento (Rosales, 2005). El LPS, el

superóxido dismutasa de Cu-Zn y el amonio pueden contribuir con ésta sobrevivencia intracelular (Chiers, 2004). Las cepas de mayor virulencia tienen la capacidad de producir una mayor cantidad de cápsula. La presencia de LPS activa la elaboración de citoquinas por parte del macrófago, como la IL-1 α , IL-1 β , IL-1 β , IL 6 e IL 8 en el fluido alveolar, que contribuyen al daño tisular asociado con la infección pulmonar. Además, las LPS activan los componentes de la vía alterna del complemento C3a y C5a resultando en la atracción y activación de neutrófilos y macrófagos y la liberación de mediadores inflamatorios responsables de la activación plaquetaria, vasodilatación y broncoconstricción (Chiers, 2004). Las infecciones concomitantes con agentes como el virus del PRRS y/o *Mycoplasma hyopneumoniae* contribuyen a un cuadro clínico más severo (Utrera y Del Castillo, 2006).

Proteasas secretadas por el *A. pleuropneumoniae* también participan en el daño tisular degradando la gelatina porcina, IgA, IgG, actina y hemoglobina. No se sabe si las proteasas pueden debilitar la opsonización in vivo. El daño de las células del epitelio alveolar por las toxinas Apx y la activación del factor XII por los LPS resulta finalmente en la formación de microtrombos, isquemia localizada y necrosis (Chiers, 2004).

Se sugiere que la vasculatura pulmonar es el blanco inicial durante la infección (Vaz, 2002). Las lesiones necróticas y hemorrágicas a nivel pulmonar pueden ser evidentes de 3 a 5 horas post infección, con presencia de congestión capilar, edema a nivel de la pared alveolar, marcándose el septo intersticial y los ganglios linfáticos se dilatan. Hay acumulación de plaquetas, neutrófilos y de fibrina que agrava el daño de la pared alveolar provocando trombosis arterial y necrosis tisular. En casos de bacteriemia el cuadro clínico se hace mucho más severo y puede presentarse muerte sobreaguda. Conforme pasa el tiempo, se produce muerte de macrófagos y neutrófilos que se acumulan en la lesión y a nivel de los bronquios. A medida que la lesión evoluciona, esta se hace necrótica y comienza un proceso de fibrosis que conduce a la cicatrización donde es posible aislar el agente. Posteriormente se produce fibrosis y el centro de la lesión tiene aspecto necrótico de color oscuro (Rosales, 2005; Palomo, 2006).

2.4.2. Signos clínicos y lesiones

Los signos clínicos varían con la edad del animal, su estado inmunitario, las condiciones ambientales y el grado de exposición al agente infeccioso. El curso clínico de la enfermedad puede adoptar tres distintas formas: hiperaguda, aguda o crónica. Las lesiones microscópicas se localizan principalmente en el aparato respiratorio que incluyen neumonía bilateral que afecta los lóbulos apicales, cardiacos y parte del diafragmático donde las lesiones neumónicas están focalizadas y bien definidas. Las lesiones se definen como una neumonía necrótica y fibrinohemorrágica con pleuritis fibrinosa (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a).

El cuadro hiperagudo se caracteriza por la aparición repentina de algunos animales enfermos con hipertermia (41.5-42°C), anorexia y apatía, con un periodo breve de vómitos, diarrea leve, tos y epistaxis. Posteriormente puede observarse cianosis en piel de nariz, orejas, patas y, finalmente, todo el cuerpo. En la fase terminal el animal asume una postura de “perro sentado” con disnea grave, secreción espumosa y teñida de sangre a través de los ollares nasales y boca antes de la muerte, que ocurre dentro de las 24 a 36 horas del desarrollo de los signos clínicos. A la necropsia se observa que la tráquea y los bronquios están llenos de exudado mucoso, espumoso y teñido de sangre. Las áreas neumónicas aparecen oscuras y sólidas con poca o ninguna pleuritis fibrinosa (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a).

En el cuadro agudo aparecen muchos cerdos afectados con depresión e hipertermia (40.5-41°C), rechazando la comida y la bebida. Se observan signos respiratorios graves como tos, disnea y ocasionalmente respiración por la boca. Se presenta insuficiencia cardíaca y circulatoria con congestión de extremidades y evidente pérdida de condición corporal después de 24 horas de iniciarse las lesiones pulmonares. La muerte ocurre por una combinación de un fallo cardíaco y de toxinas producidas por el organismo. A la necropsia la pleuritis es muy obvia y la cavidad torácica contiene líquido sanguinolento. La pleuritis fibrinosa se vuelve fibrosa y puede adherirse tan fuerte a la pleura parietal que el parénquima pulmonar puede quedarse fijado a ésta. Las lesiones pulmonares de color rojo oscuro se vuelven de color rojo brillante y permanecen firmes solo en las áreas más afectadas (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a).

El cuadro crónico aparece después de un cuadro agudo o al mismo tiempo. No existe fiebre observándose tos variable e intermitente, apetito reducido e intolerancia al ejercicio. Estos animales presentan neumonía caracterizada por respiración abdominal debido a una pleuritis muy dolorosa. Los signos clínicos pueden exacerbarse por otras infecciones respiratorias. Los animales afectados pueden transportar al microorganismo durante largos periodos de tiempo y por lo tanto representan un riesgo potencial para los cerdos más jóvenes. Las lesiones pulmonares de la fase aguda se retraen y disminuyen de tamaño a medida que la resolución progresa, hasta que en los casos más crónicos permanecen nódulos de diferentes tamaños, la mayoría de ellos localizados en el lóbulo diafragmático asociados a la pleuritis fibrinosa adherente (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a).

Un estudio realizado en una granja positiva a *A. pleuropneumoniae*, demostró el aumento de la persistencia en el tiempo de esta bacteria debido a infecciones secundarias del tracto respiratorio (Wallgren *et al.*, 2004), demostrando la importancia de otros microorganismos en la patogenia de la enfermedad.

Además de producir PCP, el *A. pleuropneumoniae* se ha asociado a otras patologías en órganos diferentes al tracto respiratorio, estando implicado en casos de otitis media (Duff *et al.*, 1996), osteomielitis, artritis (Jensen *et al.*, 1999), meningitis, nefritis, pericarditis y endocarditis (Madsen *et al.*, 2001), sin embargo aún no se ha podido demostrar su papel exacto en estas patologías.

2.5. Respuesta inmune e Inmunidad pasiva

Infecciones naturales o experimentales estimula la respuesta inmune, el cual es serotipo específica (Vaz, 2002). El perfil serológico de los animales que han sido expuestos presentan respuestas claramente definidas frente a la cápsula, los LPS, las OMP y muy marcadamente frente a las toxinas Apx. Esta inmunidad a probado ser principalmente de tipo humoral (Van Leengoed, 1993) con la IgG jugando un rol importante (Baltes, 2002); comprobándose además la ocurrencia de inmunización pasiva por transferencia de suero positivo y por vía materna (Bossé *et al.*, 1992; Oishi *et al.*, 1993; Chiers *et al.*, 2002). La inoculación de cerdos con suero inmune los protege

contra la exposición a la bacteria, indicando que una respuesta inmune sistémica contra *A. pleuropneumoniae* puede jugar un rol en la protección y que la inmunidad mediada por células no es esencial para la protección (Haesebrouck *et al.*, 1997). Sin embargo, por medio de infecciones experimentales vía aerosol en cerdos con *A. pleuropneumoniae*, se ha observado un incremento del número de linfocitos T (CD4 y CD8) en el tejido linfoide asociado a los bronquios y una concentración elevada de neutrófilos en los lavados pulmonares, que normalmente están ausentes (Delventhal *et al.*, 1992).

La respuesta inmune puede detectarse con anticuerpos circulantes entre los 10 a 14 días después de la infección, con un máximo título entre las 4 y 6 semanas postinfección. Los anticuerpos pueden mantenerse a bajo título durante muchos meses o inclusive pueden desaparecer cuando no hay más exposición a la bacteria (Rosales, 2005).

Después de la sobrevivencia a la infección natural, los cerdos desarrollan inmunidad protectora contra infecciones posteriores. Porcinos convalecientes infectados experimentalmente con *A. pleuropneumoniae*, pueden desarrollar una inmunidad protectora hacia los serotipos homólogos y una inmunidad variable hacia los serotipos heterólogos (Crujisen *et al.*, 1995); esto ocurre también con infecciones naturales a bajas dosis (Nechvatalova *et al.*, 2005), siendo ésta especie-específica (Vaz, 2002).

El rol de la IgM también ha sido descrito. Lechones que fueron expuestos a altas dosis de *A. pleuropneumoniae* a las 3 y 8 semanas de edad tuvieron niveles altos de anticuerpos IgM contra el LPS de *A. pleuropneumoniae*, aún en el caso donde altas concentraciones de anticuerpos IgG estuvieron presentes en el suero (Krejci *et al.*, 2005).

Infecciones experimentales mostraron un incremento significativo de IgA, IgM e IgG, así como de linfocitos y células plasmáticas en fluido de lavados broncoalveolares (Baltes, 2002). El rol clave en la protección del sistema inmune en casos de PCP es jugado por la IgG circulante en sangre. En las fases iniciales de la infección, estos se difunden a través de la barrera hemato-alveolar del parénquima pulmonar dañado por la

inflamación (Nechvatalova *et al.*, 2005), actuando como anticuerpos neutralizantes para las toxinas Apx (Baltes, 2002) y contra otros factores de virulencia como la capsula, LPS, OMP y proteínas de unión a la transferrina (Chiers, 2004).

Debido a que las mucosas son la primera vía de contacto con el microorganismo, el rol de las IgA en la etapa inicial de la infección resulta muy importante. Estas inmunoglobulinas presentes en los fluidos nasales y broncoalveolares son importantes para la opsonización y neutralización de la bacteria antes de que ésta pueda alcanzar las vías respiratorias inferiores. A las IgA les suceden las IgG, detectables en suero en estados más avanzados de la infección (Medrano, 2003). En el tracto respiratorio superior predomina la IgA, mientras que la IgG se encuentra en mayor número en los bronquios y alvéolos, teniendo importancia en la fijación del complemento y adhesión a los macrófagos (Vaz, 2002). Estudios similares demostraron que existe una respuesta primaria de anticuerpos específicos, con elevación de IgM en suero, en presencia de niveles altos de anticuerpos calostrales en animales desafiados experimentalmente (Krejci *et al.*, 2005). Los anticuerpos contra la toxina ApxIV no se producen en animales que son portadores de la bacteria a nivel nasal, sin colonización e infección tonsilar o pulmonar (Schaller, 1999).

Los anticuerpos calostrales también proveen protección a lechones bajo condiciones naturales. Infecciones naturales a baja dosis de parte de la marrana también provee protección total o parcial a sus crías (Nechvatalova *et al.*, 2005).

Los anticuerpos maternos pueden persistir entre 2 y 8 semanas de edad, incluso hasta la semana 12, dependiendo esto del nivel inicial de anticuerpos calostrales ingeridos (Chiers *et al.*, 2002; Utrera *et al.*, 2002; Vigre *et al.*, 2003). Estos anticuerpos están dirigidos principalmente contra las toxinas Apx (Baltes, 2002). Mediante esa inmunidad pasiva el lechón puede tener protección contra la enfermedad (Rosales, 2005), aunque a partir de las tres semanas de vida sus niveles disminuyen por debajo del umbral mínimo de protección (Nicolet, 1992). Esto concordaría con la detección por PCR del antígeno en animales a partir de las 4 semanas de edad, cuando esta técnica se aplica en explotaciones con infecciones endémicas (Chiers *et al.*, 2002). No existe correlación entre los niveles de inmunoglobulinas dirigidos contra antígenos capsulares serotipo

específicos y la protección. Esto contrasta con la inmunidad protectora asociada con el nivel de anticuerpos específicos contra las toxinas (Utrera y Del Castillo, 2006).

Se ha demostrado que lechones de 11 días, nacidos de madres positivas a *A. pleuropneumoniae*, pueden ser positivos a la infección en presencia de anticuerpos maternos, detectándose el microorganismo a nivel tonsilar por PCR; demostrándose también que el 70% de los porcinos infectados fueron detectados a la edad de 9 semanas, alcanzando el 100% a las 17 semanas de edad. La seroconversión de los animales infectados se observó entre 2 y 4 semanas luego de la detección de la infección (Vigre *et al.*, 2002).

Lechones provenientes de madres con alta concentración de anticuerpos antes del parto, presentaron niveles de anticuerpos maternos hasta la semana 5, en comparación con los provenientes de madres con menor concentración de anticuerpos, que solo lo presentaron hasta la semana 1, así mismo la concentración de anticuerpos en la leche fue detectada hasta las 24 horas post parto (Sjölund *et al.*, 2004).

Otros estudios establecen que el título de anticuerpos calostrales decrecen a partir de la semana 8, encontrándose seroconversión a partir de la semana 16, lo que denota que la infección se produce a partir de la semana 12 (Chiers *et al.*, 2002). Similares resultados fueron hallados en otros estudios (Wallgren *et al.*, 2004). La colonización de tonsilas y cavidad nasal se detectó a partir de la semana 4, lo cual confirmó el establecimiento de la infección en presencia de anticuerpos calostrales, produciéndose la colonización pulmonar a partir de la semana 12, sospechándose que los anticuerpos prevenían la infección pulmonar. Sin embargo animales con tonsilas y cavidad nasal positivas eran negativos serológicamente, sugiriendo que tal infección no provoca seroconversión (Chiers *et al.*, 2002).

Estudios serológicos practicados a partir de muestras de lavados nasales y broncoalveolares y de suero sanguíneo de porcinos infectados experimentalmente demostró la presencia de anticuerpos maternos por encima de las 8 semanas de vida, determinándose además que los anticuerpos producidos post infección era de tipo IgA, a diferencia de los anticuerpos maternos que son del tipo IgG. Es por eso que, por medio

de la detección de IgM en suero e IgA en lavados nasales y broncoalveolares, es posible detectar animales infectados subclínicamente en presencia de anticuerpos maternos (Nechvatalova *et al.*, 2004). La infección induce una elevación en los niveles de IgA en fluidos broncoalveolares sin tener en cuenta la severidad de la infección y la presencia de anticuerpos calostrales. Las IgG solo se elevan en el fluido broncoalveolar de cerdos sin anticuerpos maternos (Krejci *et al.*, 2005). Estos anticuerpos en asociación con otros componentes humorales y celulares del exudado inflamatorio puede prevenir las formas severas de la enfermedad (Nechvatalova *et al.*, 2005). Anticuerpos dirigidos contra LPS, cápsula y OMS pueden servir como opsoninas efectivas, facilitando la fagocitosis del *A. pleuropneumoniae* por los neutrófilos (Haesebrouck *et al.*, 1997).

Además del papel jugado por los anticuerpos, la infección provoca la secreción de numerosas citoquinas inflamatorias, especialmente las IL-1 e IL-8 que podrían ser importantes en la respuesta local en alvéolos. Estas aparecen al cabo de dos horas de iniciarse la infección y provoca la inflamación de neutrófilos y de macrófagos, lo cual puede contribuir a la formación de lesiones en el tejido pulmonar (Baarsch *et al.*, 1995). Como respuesta al estímulo de las endotoxinas se secretan TNF (factor de necrosis tumoral) e IL1, factores que generan hipertensión, fiebre y, eventualmente, contribuyen al choque séptico (Medrano, 2003).

La vacunación de las madres preñadas ha demostrado poseer un efecto positivo en la estabilización de la inmunidad del rebaño y en reducir la incidencia del problema en cerdos destetados con aumento en la duración de los anticuerpos calostrales hasta en 4 semanas más en promedio (Utrera *et al.*, 2002). El uso de vacunación simultánea contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae* ha demostrado ser efectivo para garantizar un buen nivel de inmunidad calostrales contra ambas enfermedades (Kristensen *et al.*, 2004).

2.6. Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo puede ser realizado a través de los hallazgos de la necropsia; en tanto que, el diagnóstico definitivo exige el aislamiento del agente así como la diferenciación con otros patógenos presentes en el tracto respiratorio (Costa *et*

al., 2004). La presencia de lesiones características pulmonares y/o el aislamiento de *A. pleuropneumoniae* de estas lesiones en brotes de enfermedad respiratoria aguda, no quiere decir que el *A. pleuropneumoniae* sea la causa primaria. El *A. pleuropneumoniae* puede actuar como patógeno secundario después de una infección viral o por *Mycoplasma hyopneumoniae* (Chiers, 2004).

Como diagnóstico diferencial, se deben considerar las infecciones causadas por el *Actinobacillus suis* y *Salmonella choleraesuis* o la combinación de otros agentes como el *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *Mycoplasma hyorhinis*, cuyas lesiones producidas son similares a la PCP. En las fases agudas y superagudas, el diagnóstico diferencial debe considerar principalmente al cólera porcino, erisipela e infecciones estreptocócicas. En casos subagudos o crónicos, las lesiones pulmonares deben ser diferenciadas de aquellas producidas de infecciones por *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Fusobacterium necrophorum* (Vaz, 2002). Por otro lado, la presentación crónica también puede diagnosticarse mediante la observación de los nódulos, abscesos, hemorragias y adherencias de pulmones en el matadero (Rosales, 2005), siendo más difícil el aislamiento de la bacteria a partir de estas lesiones. Sin embargo, mediante la observación anatómica no es posible detectar infecciones subclínicas o asintomáticas (Zielinski, 2006). Además, el serotipo deberá ser identificado, lo que permite un seguimiento epidemiológico utilizando la serología (Gottschalk, 2004).

Actualmente los métodos de diagnóstico de las infecciones por *A. pleuropneumoniae* son muy diversos y han evolucionado durante los últimos años. El proceso más corriente para el diagnóstico de la PCP es un diagnóstico de laboratorio mediante pruebas bacteriológicas o serológicas (Schaller *et al*, 2001), además del diagnóstico por PCR.

2.6.1 Diagnóstico bacteriológico

El aislamiento bacteriológico a partir de pulmones de animales muertos por PCP no es complicado si se utilizan los medios adecuados (Gottschalk, 2004). Los métodos bacteriológicos se basan en el cultivo e identificación a partir de muestras clínicas. Las

muestras deben ser frescas ya que la congelación reduce en gran medida la viabilidad de la bacteria. El aislamiento se logra a partir de muestras de pulmón procedentes de cerdos afectados, no tratados y remitida en refrigeración, así como de hisopados nasales, tonsilas y lavados traqueales (Radostis *et al.*, 2002). Además del agar sangre, algunos de los medios de cultivo más empleados son el agar chocolate y el agar PPLO. La prueba de CAMP es una importante herramienta para la taxonomía e identificación del *A. pleuropneumoniae*. La reacción de CAMP es variable entre los serotipos, no siendo observada en todos los aislamientos de los serotipos 3 y 7. Muestras de los serotipos 1, 5 y 9 son generalmente hemolíticas y CAMP positivas (Costa *et al.*, 2004).

Las cepas del biotipo 2 son fácilmente diferenciables del biotipo 1 por la no dependencia del NAD para su multiplicación, sus colonias son mayores en agar sangre, en el cual la hemólisis es más fuerte y se multiplica mejor en caldos que en medios de cultivo sólidos (Vaz, 2002).

La diferenciación de otras especies dependientes de NAD se puede realizar mediante pruebas bioquímicas. La mayoría de las veces el aislamiento por cultivo es un complemento al diagnóstico *post mortem* a partir de análisis de las lesiones pulmonares. Aunque el cultivo es específico, posee una sensibilidad relativamente baja (Radostis *et al.*, 2002).

En lesiones agudas, el *A. pleuropneumoniae* puede ser aislado a través de siembra directa en agar sangre suplementado con NAD; muchas veces sin el uso de medios selectivos debido a la presencia de gran número de bacterias, principalmente si es obtenido del pulmón el cual normalmente será libre de flora contaminante. En casos crónicos el aislamiento directo es difícil, muchas veces siendo negativo, lo que no puede ser debido a la presencia de bacterias en menor número, sino al efecto inhibitorio de otros patógenos sobre el crecimiento del *A. pleuropneumoniae* (Vaz, 2002).

El aislamiento de *A. pleuropneumoniae* a partir de cerdos portadores es difícil por la presencia de flora bacteriana mixta en muestras de la cavidad nasal y tonsilas; para ello se han desarrollado técnicas modernas entre las cuales se incluye la técnica de

separación inmunomagnética el cual resulta ser más sensible que la técnica tradicional (Angen *et al.*, 2001); pero resultan ser más caras y engorrosas (Zielinski, 2006).

2.6.2. Diagnóstico serológico

Se emplean métodos serológicos como complemento de las técnicas bacteriológicas o como herramienta independiente, cuyo objetivo puede ser la detección de la respuesta frente a *A. pleuropneumoniae*, independientemente del serotipo o con identificación de serotipo (Medrano, 2003). Este es un diagnóstico indirecto, debido a que se detecta la respuesta inmunológica de los animales frente a una infección pasada. Es por eso que la prueba utilizada debe poseer muy buena sensibilidad y especificidad, pues el diagnóstico puede hacerse en granjas donde no se observa ningún problema que pueda hacer pensar que el *A. pleuropneumoniae* esta presente (Gottschalk, 2004).

Dentro de las pruebas serológicas nos encontramos con una amplia gama de métodos: hemoaglutinación indirecta, fijación de complemento (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a), prueba de aglutinación (Rosales, 2005), aglutinación lenta en tubo, aglutinación rápida en portaobjetos, inmunofluorescencia indirecta etc. Dentro de todas ellas, la fijación de complemento ha sido la más utilizada, siendo inmunologicamente más específica que la prueba de hemoaglutinación indirecta ya que distingue entre *A. pleuropneumoniae* y el *Haemophilus parasuis*, pero su validez para el serotipado es cuestionable debido a la alta frecuencia de falsos negativos, además de ser una prueba muy laboriosa y compleja (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a).

2.6.2.1 Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas (ELISA)

Ninguna de las técnicas de serología clásica permite la estandarización y versatilidad en el procedimiento de las muestras que sí ofrece el análisis serológico por ELISA. La mayoría de los ELISA que se han desarrollado son de tipo indirecto. Los ELISA descritos están basados en antígenos muy diversos, sin embargo la purificación del antígeno específico del serotipo aun no es posible (Coelho *et al.*, 2004).

Aunque estas pruebas son, por lo general, más sensibles que la fijación del complemento, muchas de ellas pueden presentar reacciones inespecíficas. Algunos autores han propuesto un tamizado inicial de las muestras utilizando un ensayo tipo ELISA y una confirmación posterior por fijación del complemento de las muestras positivas (Enoe *et al.*, 2001). El costo de la estrategia combinada puede llegar a ser mucho menor que el derivado de utilizar directamente la fijación del complemento, especialmente en áreas de baja prevalencia de la enfermedad. Otro inconveniente puede ser que muchos de estos ELISA detectan un número limitado de serotipos. Algunos sistemas desarrollados usando las toxinas Apx de *A. pleuropneumoniae* parecen ser poco específicos, debido probablemente a reacciones cruzadas con toxinas RTX producidas por *A. suis* o la α -hemolisina de *E. coli* (Medrano, 2003).

El ELISA basado en antígenos de cadenas largas del LPS del *A. pleuropneumoniae* (LC-LPS ELISA), es utilizado en los Estados Unidos, Canadá y Francia (Gottschalk, 2005). Esta prueba detecta diversos serotipos, poseyendo mucha especificidad para el serotipo respectivo. Esta prueba es útil para identificar los serotipos presentes en una granja y determinar si los que están son o no patógenos y virulentos. Tiene como desventaja la reacción cruzada con anticuerpos vacunales, así como el elevado costo del diagnóstico si es que se quiere determinar cuales serotipos están presentes en una granja (Rosales, 2005).

La prueba de ELISA indirecta (CIVTEST SUIS APP), detecta *A. pleuropneumoniae* en dos grandes grupos: el grupo 1 se identifican los serotipos 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 12 mientras que en el grupo 2 se identifican los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11. El antígeno utilizado para el grupo 2 posee la toxina ApxI por lo que los serotipos identificados suelen ser los más patógenos y virulentos por expresar esta toxina, a diferencia del grupo 1 que no secretan esta toxina y se detectan mediante un antígeno de la proteína externa (OMP) llamado Tpb2 (Rosales, 2005).

Recientemente, ha sido desarrollada una prueba de ELISA que detecta únicamente anticuerpos contra la toxina ApxIV (CHEKIT-APP-ApxIV), la cual es exclusiva de *A. pleuropneumoniae*, la secretan todos los serotipos y se produce solo en animales infectados, por lo que cerdos vacunados no reaccionan a la prueba, pudiendo diferenciar

la infección de la vacunación. Esta prueba es útil para determinar con certeza la presencia de infección de *A. pleuropneumoniae* en una granja, sin embargo tiene la limitante de no identificar el serotipo presente en la población y así conocer si es patógeno o no. Esta prueba posee una especificidad del 100% y una sensibilidad del 93.8% (Schaller *et al.*, 2003; Dreyfus *et al.*, 2004), y permite detectar *A. pleuropneumoniae* en granjas positivas sin signos clínicos ni patológicos (Dreyfus *et al.*, 2004). Un problema que aparece cuando se utilizan estos tipos de pruebas, debido a que las toxinas se producen, principalmente, durante el proceso de la enfermedad y, por tanto, los anticuerpos contra estos factores aparecerán después de la replicación activa de las bacterias. Los animales portadores afectados de forma subclínica, pueden albergar *A. pleuropneumoniae* en sus amígdalas sin unos niveles elevados de replicación bacteriana. Se ha observado que estos animales, que no presentan lesiones pulmonares, no producen altos niveles de anticuerpos contra las toxinas (Gottschalk *et al.*, 2003). Esta prueba puede ser utilizada sobretodo en granjas de muy alto nivel sanitario y que no están infectadas con ningún serotipo de *A. pleuropneumoniae*. Las granjas negativas a todos los serotipos podrían ser vacunadas para agregar una protección suplementaria sin provocar problemas en el diagnóstico, ya que la prueba ApxIV será negativo (Gottschalk, 2004).

Otra alternativa para el monitoreo serológico del *A. pleuropneumoniae* se basa en el uso del suero del calostro como muestra para detectar los niveles de anticuerpos presentes en ella; las muestras de calostro pueden obtenerse hasta las 18 horas post parto ya que después, el nivel de anticuerpos decae significativamente variando el porcentaje de animales positivos a la prueba. Estas muestras pueden conservarse por 10 meses a -10°C sin cambios en los resultados. Sin embargo, una de las desventajas es que solo puede usarse en marranas cerca al parto y no en otros animales (Batista *et al.*, 2006).

2.6.3. Diagnóstico por PCR

El conocimiento que se tiene actualmente sobre el genoma del *A. pleuropneumoniae* ha permitido el desarrollo de otro método de diagnóstico basado en la detección directa del patógeno por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), considerablemente más

sensible que el aislamiento por cultivo y altamente específico. Esta técnica complementa a la serología, por lo cual es posible detectar portadores del patógeno serológicamente negativos. Por otro lado, si bien el aislamiento de la bacteria no resulta complicado a partir de animales con infecciones agudas, cuando los animales son portadores crónicos la bacteria puede encontrarse sólo en niveles muy bajos en el tracto respiratorio superior, donde la flora comensal ofrece grandes impedimentos al aislamiento de la bacteria patógena (Medrano, 2003).

El uso de esta metodología es cada vez más frecuente ya sea para la detección de *A. pleuropneumoniae* independientemente del serotipo (Chiers *et al.*, 2001; Schaller *et al.*, 2001) o para la tipificación. En el diagnóstico de la PCP, la técnica de PCR facilita la identificación de muestras no serotificables, así como reduce el tiempo necesario para la obtención de resultados en hasta un día de trabajo (Cho y Chae, 2001b). Teniendo en cuenta la alta sensibilidad, especificidad y facilidad en la ejecución de la técnica de PCR y a la presencia de la capsula en los aislamientos de *A. pleuropneumoniae*, la amplificación del gen *cpx* viene siendo utilizada para su diagnóstico (Klein *et al.*, 2003). Varias pruebas de PCR basados en los genes que codifican las toxinas Apx fueron desarrollados para el diagnóstico de la PCP. Sin embargo, la homología con los genes de las toxinas ApxI y ApxII del *A. suis* impide la aplicación de estos genes en el diagnóstico de la infección por *A. pleuropneumoniae*, sin el aislamiento del agente (Costa *et al.*, 2004).

Un paso más para el diagnóstico lo constituye el uso de la PCR en tiempo real para el diagnóstico de *A. pleuropneumoniae*. Este método se ha aplicado en la amplificación del gen *omIA* (Angen *et al.*, 2001). Otros PCR se basan también en la amplificación de una fracción del gen que codifica la toxina ApxIV (Schaller *et al.*, 2001). El desarrollo de métodos de PCR múltiple con el objetivo de identificar especie y serotipo al mismo tiempo, usando los primers adecuados, están siendo desarrollados (Jessing *et al.*, 2003).

Otros métodos de diagnóstico han sido probados, como es el caso de la detección del gen *apxIV* por medio de la hibridación *in situ* en pulmones de cerdos infectados (Cho *et al.*, 2002). La técnica de RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) se basa en la amplificación de fragmentos específicos del DNA genómico, utilizando apenas un

pequeño iniciador con secuencia arbitraria de nucleótidos. La amplificación por RAPD puede ser utilizada para la clasificación de aislamientos de *A. pleuropneumoniae* (Costa *et al.*, 2004).

2.7. Control y Prevención

Las nuevas estrategias de control consiste en determinar que tipo de manejo, factores ambientales o de los hospederos necesitan ser alterados o eliminados para evitar que la enfermedad, que en determinado punto se posiciona como un problema menos serio, se transforme en algo más grave. Las estrategias de manejo “todo dentro/todo fuera”, la limpieza y desinfección y la reducción de la carga animal son aconsejables para la minimización de la incidencia de la PCP (Coelho *et al.*, 2004).

En explotaciones libres, en las que se haya certificado la ausencia de portadores, la atención se centra siempre en el control más absoluto en la entrada de animales de reposición, sobre los que será necesario aplicar una cuarentena y un control serológico exhaustivo para detectar animales con infecciones subclínicas y aislamientos microbiológicos, en combinación con pruebas de detección de antígeno en vías respiratorias superiores, siendo esta estrategia una de las más usadas en países con programas de erradicación, como es el caso de Dinamarca (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002b; Medrano, 2003).

Solo cuando el porcentaje de animales seropositivos es inferior al 30% resulta posible mantener un control efectivo de la enfermedad. Para ello se separan los animales seropositivos y se les somete a medicación intermitente dirigida a evitar la aparición de síntomas clínicos. Sobre todo es crítico el manejo de las cerdas y los lechones realizando seguimiento serológico de ambos grupos, destete precoz y creación de grupos de aislamiento por edades (Medrano, 2003).

En explotaciones serológicamente positivas, pero sin clínica, deben evitarse las situaciones de estrés. Puede llevarse a cabo el destete en otra granja al tiempo que un programa de vacunación y medicación. Paralelamente se debe desarrollar un programa de selección y repoblación con animales sanos con entrada restringida a animales

serológicamente negativos precedidos de su vacunación. Cuando el porcentaje de seropositivos no es muy alto, ha resultado útil el diagnóstico y la separación de los positivos, que se medican; además, se estudian las cerdas antes del parto (las positivas se eliminan), se hace un destete precoz de los lechones (a las 2 semanas) y un tratamiento, manteniéndolos después separados de los lotes potencialmente infectados (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002b). En el peor de los casos se sugiere la erradicación con la consecuente pérdida del potencial genético (Coelho *et al.* 2004).

En explotaciones positivas y con signos clínicos, se presentan brotes agudos en animales de entre 9 y 20 semanas y aunque un tratamiento precoz puede limitar la gravedad de un brote, no son descartables recidivas. En granjas comerciales con signos clínicos agudos, es probablemente más rentable controlar la mortalidad y vivir con la infección. Para ello, la vacunación es la metodología más rentable (Gottschalk, 2004).

La medicación continua puede ser práctica pero no debe ser usada de forma sistemática, debiéndose monitorear continuamente la sensibilidad a los antibióticos (Coelho *et al.*, 2004). Las metodologías de destete precoz (medicado o no) pueden ofrecer buenos resultados, sobre todo cuando el destete se realiza antes de los 15 días de vida de los lechones, no siendo sin embargo del todo efectivas (Gottschalk, 2004).

2.7.1. Erradicación

El método de testaje serológico y la eliminación de animales positivos a la serología, con un tratamiento antimicrobiano general, ha dado resultados contradictorios. Esta metodología es evidentemente menos costosa que la eliminación de todos los animales y el reemplazo de todos los animales no infectados (Gottschalk, 2004). Cuando el porcentaje de seropositivos es alto y los síntomas clínicos son evidentes resulta imposible su control basado únicamente en el manejo y la medicación selectiva. Se impone entonces un sacrificio parcial o total de los animales, seguido por una reposición con animales procedentes de rebaños clínicamente y serológicamente negativos (Radostis *et al.*, 2002; Medrano, 2003).

La eliminación de todos los animales y el repoblamiento con animales no infectados, es un método que ofrece buenos resultados, pero es drástico y costoso, y la sola infección causada por el *A. pleuropneumoniae* probablemente no justifica la inversión financiera (Gottschalk, 2004).

2.7.2. Vacunación

No existe ninguna vacuna que sea 100% efectiva. La vacunación puede disminuir el nivel de mortalidad y el grado de las lesiones pulmonares pero no impide la infección ni la elimina de los animales ya infectados. (Gottschalk, 2004) Desde los más antiguos hasta los productos más recientes, se han experimentado diversidad de combinaciones, en las que algunos factores de virulencia, especialmente las Apx, han centrado el interés (Rodríguez Ferri *et al*, 2002b).

La vacunación debe efectuarse en el momento oportuno. Las cerdas jóvenes mantienen muchas veces activa la infección por lo que se recomienda vacunarlas antes de hacerlas entrar en contacto con las más viejas. Además, la vacunación de todas las madres es muchas veces beneficiosa para estabilizar la inmunidad del hato y guardar un mismo nivel de anticuerpos maternos (Utrera *et al.*, 2002).

En el engorde, la serología puede utilizarse para saber en que momento los animales se infectan, y decidir en que momento se debe vacunar a los lechones. Muchas veces, la presencia de una infección de virus PRRS disminuye la respuesta a la vacunación contra *A. pleuropneumoniae*, por lo que el momento ideal de la vacunación debe ser analizado muchas veces caso por caso (Gottschalk, 2004).

Bacterinas: Incluyen el microorganismo completo, del serotipo predominante en la explotación o en la región, inactivado con formol al 0.2%. La concentración oscila en torno a 10^9 - 10^{10} UFC/ml, aplicado con un adyuvante que refuerza la respuesta inmune (Rodríguez Ferri *et al*, 2002b). Estas vacunas inducen una respuesta inmune elevada contra antígenos capsulares, sin embargo no estimulan la respuesta contra las toxinas hemolíticas y citotóxicas (Rosales, 2005). En este tipo de productos la protección sólo es homóloga, por lo que se suele incorporar más de un serotipo. Las bacterinas reducen

la gravedad y la mortalidad, pero no resuelven el problema de la prevención ni la persistencia de lesiones o la presencia de portadores (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002b).

Vacunas de extractos: Se han utilizado extractos crudos de cultivos jóvenes, concentrados o no, en ocasiones precipitados con polietilenglicol o cetavión (para la cápsula), conjugados con Apx, LPS y carbohidratos y, por lo general, con adyuvantes, aunque en general solo han reducido la mortalidad o las lesiones, pero no resolvieron el problema de los portadores.

Vacunas atenuadas: Se han obtenido distintos mutantes atenuados con los que se ha inducido inmunidad protectora, como la cepa CM5 del serotipo 1 o la cepa BES, pero solo se han conseguido descensos en la mortalidad y lesiones. También se han obtenido mutantes acapsulados, atenuados por mutagénesis química, de los serotipos 1 y 5, que han sido estudiadas en condiciones experimentales. Una dosis de 2×10^9 UFC induce una fuerte respuesta capaz de resistir el desafío intratraqueal, tanto del serotipo homólogo como heterólogos, sin síntomas ni lesiones (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002b).

Vacunas de subunidades: El LPS se ha utilizado detoxificado y adyuvantado con resultados protectores, aunque inferiores a los conseguidos con una bacteria. Algunas OMP del serotipo 5 adyuvantadas también fueron investigadas obteniendo un descenso significativo en el número de casos de neumonía después de la infección intranasal con la cepa homóloga. Se estudiaron polisacáridos y proteínas capsulares, a partir de sobrenadantes de cultivo de los serotipos 5 y 7, precipitados con cetavión y mezclados con un adyuvante oleoso. Todos los ratones inmunizados intraperitonealmente sobrevivieron a la infección con el serotipo homólogo, pero no con el heterólogo. Una nueva categoría de vacunas están basadas en la utilización de las toxinas purificadas (ApxI, ApxII y ApxIII) teniendo la ventaja de ser protectoras contra todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* (Gottschalk, 2004), y poseyendo además una OMP. Estas ofrecen buena protección ya que los anticuerpos dirigidos a las toxinas neutralizan la acción hemolítica y citotóxica, que representan el principal mecanismo de patogenicidad de la bacteria (Rosales, 2005).

Se ha descrito el uso vacunal experimental (en el ratón) de Apx-I recombinante en *E. coli* y de la Apx-II purificada del serotipo 7, adyuvantadas con hidróxido de aluminio, obteniéndose resultados protectores frente a algunos serotipos, pero no frente a otros. También se ha utilizado un sobrenadante crudo de cultivo del serotipo 1, con Apx-I, solo o mezclado con una preparación inactivada de células enteras, en ambos casos con un adyuvante oleoso, siendo esta combinación la que comparativamente produjo los mejores resultados en forma del título de anticuerpos (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002b).

Vacunas conjugadas: Se ha estudiado una vacuna de oligosacáridos de la pared celular conjugados con un toxoide tetánico, comprobándose que los polisacáridos desempeñan un papel significativo en la inmunidad. También se ha desarrollado una vacuna conjugada, que combina la Apx-I de los serotipos 1 ó 5b con OMP del serotipo 1 y un adyuvante con excelentes resultados de mortalidad, pero no en el desarrollo de lesiones. También se ha estudiado la mezcla de polisacárido capsular con hemolisina o su conjugación con el LPS, produciéndose un aumento significativo del título de anticuerpos, con descenso de la mortalidad y lesiones, pero el producto no resolvió satisfactoriamente el control (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002b).

Se han utilizado dos antígenos recombinantes del serotipo 7, que incluyen el extremo C-terminal de la Apx-II y una Tbp de 60 kDa. Todos los animales desarrollaron una fuerte respuesta humoral, comparable a la que se inducía en la infección natural, con una menor mortalidad y afectación que los controles, pero solo frente a la exposición con el serotipo homólogo. Otros investigadores han ensayado un preparado constituido por antígenos de células enteras y por el toxoide Apx-I, con el que han obtenido una importante reducción de la mortalidad de los animales vacunados. Por último, ha sido descrito una vacuna preparada a base de antígenos asociados a células recombinantes, así como antígenos secretados, entre ellos, proteínas de unión a transferrina y la toxina Apx-II. El preparado ha sido contrastado frente a la inoculación endobronquial del serotipo 9, con resultados de protección aceptables (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002b).

2.8. Tratamiento

Las resistencias de los antibióticos son frecuentes frente a *A. pleuropneumoniae*, variando con su uso, frecuencia, dosis y frente a los diferentes serotipos. Los cerdos afectados dejan de beber y de comer. Debido al curso agudo de la enfermedad es muy importante identificar rápidamente el inicio de la misma.

La antibioterapia es efectiva en animales con afección clínica solo en la fase inicial de la enfermedad, cuando puede reducir la mortalidad. Un tratamiento tardío no previene lesiones crónicas aunque el animal se recupere. La antibioterapia no elimina la infección de la granja aunque exista éxito clínico.

Para el tratamiento se basará ante todo en la elección del antibiótico más sensible en cada granja. Aquí se incluyen una amplia gama de antibióticos tales como la doxiciclina, oxitetraciclina, penicilina, ampicilina, amoxicilina, trimetoprim +sulfamida. Otros antibióticos utilizados destacan la tiamulina, valnemulina, lincomicina, tilmicosina, tulatromicina, enrofloxacina, ceftiofur, florfenicol, norfloxacina, cefalexina (Palomo, 2006).

Hay que considerar que en los tratamientos vía alimento y agua de bebida, que existe en cuadros agudos una disminución muy considerable del consumo, lo cual nos exige definir bien las dosis, previo cálculo preciso del consumo real en el momento de la medicación. Los tratamientos vía agua de bebida son más eficaces por una menor variación interanimal en los consumos diarios, considerando su calidad y la pérdida de actividad en la misma de ciertos antibióticos. En el alimento granulado también se debe tener muy en cuenta la pérdida de actividad antibiótica de ciertas moléculas ya que el curso de dicha enfermedad es muy rápido. Los tratamientos parenterales son preceptivos en animales individuales afectados.

Tratamiento por vía parenteral.

Es la mejor vía de tratamiento debido al curso agudo de la enfermedad. Para conseguir elevados y eficaces concentraciones en sangre, los tratamientos deben de

aplicarse cada 8 horas durante el primer día y cada 12 horas los dos días siguientes con alguno de los antibióticos anteriormente citados (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a).

Tratamiento por vía peroral (agua y/o alimento)

El tratamiento en el agua de bebida puede utilizarse en animales que aún tienen capacidad de beber (fases iniciales de la enfermedad). Esta vía es bastante efectiva para prevenir la enfermedad cuando se realiza de forma estratégica tratando los animales durante 4 - 7 días con algunos de los siguientes antibióticos recomendados:

- Fenoximetil Penicilina: 100 - 200 g. / 1000 l.
- Clortetraciclina: 250 - 400 g. / 1000 l.
- Trimetoprim /Sulfonamidas: 150 -250 g./ 1000 l.
- Oxitetraciclina. 250 - 400 g. / 1000 l. de agua.

La medicación en la comida debe de plantearse siempre como estratégica y siempre que los animales estén comiendo. Los antibióticos recomendados son los mismos que para el tratamiento en agua de bebida pero con dosis doble y por tonelada de pienso. El uso de tilmicosina en la comida da resultados bastante efectivos (Rodríguez Ferri *et al.*, 2002a).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de Estudio

El presente estudio se realizó en una granja porcina tecnificada en el distrito de Chíncha Baja, ubicado en la provincia de Chíncha, en la región Ica; a la altura del Km. 201 de la Panamericana Sur, seropositiva a la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Las muestras de suero extraídas fueron procesadas en la Unidad de Bacteriología del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. Sistema de Manejo de la Granja

Esta granja posee un total de 500 madres de un cruce para línea materna, siendo la producción en tres sitios con un sistema “todo dentro/todo fuera”. Aquí se realizan vacunaciones contra *Mycoplasma hyopneumoniae* tanto para las madres como a sus crías; y, contra rinitis atrófica, erisipela y cólera porcino solo a las crías. No se han aplicado vacunas contra pleuroneumonía porcina a pesar de haber sido detectado su presencia por bacteriología y serología.

Los lechones al nacer ingieren el calostro y posteriormente son uniformizados de acuerdo al tamaño del animal y número de lechones por camada. Aquí permanecen junto a la madre hasta el destete que dura 19 ± 2 días. Estos lechones son transportados

al área de recría donde son uniformizados nuevamente y distribuidos en jaulas de acuerdo al peso, aquí permanecen aproximadamente hasta los 70 días de edad. Posteriormente estos cerdos pasan al área de engorde distribuyéndolos en corrales con piso de cemento y uniformizados de acuerdo al peso y sexo permaneciendo en este lugar hasta alcanzar los 90 Kg. de peso vivo, que corresponde al peso al beneficio, aproximadamente a los 145 días de edad.

La granja cuenta con un sistema estricto de bioseguridad poseyendo, para este sentido, pediluvios y rodiluvios con desinfectantes, además de tener bien definida y demarcada la zona sucia de la zona limpia permitiéndole un mejor manejo sanitario. Todas las visitas, como los trabajadores, se bañan y utilizan la ropa proporcionada por la granja. Sin embargo, la granja tiene continuamente problemas de índole respiratorio.

3.3. Animales y Diseño de Estudio

Se seleccionaron dentro de la granja 15 madres al azar de diferente número de partos; y, posteriormente, se eligió 30 lechones al azar, crías de las madres antes mencionadas, sin distinción de sexo ni tamaño. Estos lechones fueron muestreados a los 17, 42 y 73 días de edad, siendo identificados para su posterior seguimiento. El número de lechones a muestrear se calculó mediante el “Teorema del Límite Central”.

Estos lechones fueron identificados mediante tatuaje de su oreja, con un número de dos dígitos, para poder realizar el seguimiento individual hasta el último día de muestreo. Una vez identificados los lechones fueron uniformizados y distribuidos por el personal de la granja de acuerdo a su tamaño. El manejo fue el mismo al utilizado con los demás animales dentro de la granja.

En una primera fase, se determinó cuantas de las madres muestreadas resultaron positivas a la presencia de anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae* un mes antes del parto; y, posteriormente, en una segunda fase se muestrearon a las crías de las madres positivas, a los 17, 42 y 73 días que corresponde al destete, mitad y final del período de recría, respectivamente; esto para determinar la persistencia de los niveles de anticuerpos maternos en estos animales hasta el final de la etapa de recría.

3.4. Materiales para la toma de muestra

- Tubos Vacutainers
- Agujas Vacutainers (1' x 22 y 1'1/2 x 20)
- Cooler
- Bolsas de hielo
- Soporte (Holder)
- Alcohol
- Algodón
- Tintura de yodo

3.5. Materiales y Equipo de Laboratorio

- Gradillas
- Pipetas monocanales y multicanales
- Tips
- Viales de 2ml
- Soporte de viales
- Erlenmeyer
- Agua destilada o desionizada
- Centrifugadora
- Kit de ELISA CHEKIT®-APP-Apx IV
- Congeladora
- Estufa a 37°C
- Espectrofotómetro

3.6. Obtención de Muestras

Tanto a las madres como a sus crías se les extrajo muestras de sangre (5ml aproximadamente) a partir de la vena marginal de la oreja, en el caso de las madres, y

de la vena cava craneal, en el caso de los lechones, por medio de agujas vacutainer con tubos de vacío previa desinfección de la zona a extraer.

Posteriormente, estas muestras fueron debidamente identificadas y transportadas en un cooler conteniendo medios refrigerantes, manteniéndose las muestras a una temperatura entre 0 y 10°C hasta su llegada al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.7. Procesamiento de muestras

Los sueros sanguíneos fueron obtenidos a partir de las muestras de sangre recolectada mediante centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos, siendo luego colocados en tubos estériles y debidamente identificados, para posteriormente congelarlos a -20°C hasta su posterior análisis.

Los sueros sanguíneos se analizaron por medio de la prueba de ELISA indirecta, mediante el kit comercial de ELISA CHEKIT®-APP-Apx IV el cual detecta anticuerpos contra la toxina ApxIV que se encuentra presente en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae*, la cual posee una sensibilidad del 95% y una especificidad del 99%.

Procedimiento

3.7.1. Preparación de los reactivos

- a. Se esperó que todos los reactivos alcancen la temperatura del laboratorio.
- b. Se determinó la cantidad de solución de lavado y dilución CHEKIT necesaria para el lavado de las microplacas y dilución del conjugado. Se diluyó la solución CHEKIT 10x concentrada con agua destilada 1:10. esta preparación fue realizada bajo condiciones de esterilidad (agua y frascos estériles).

3.7.2. Dilución, distribución e incubación de las muestras y controles

- a. Se dispensó 90 μ l de diluyente de muestras CHEKIT en los pocillos de la placa de microtitulación.
- b. Se dispensó 10 μ l de muestras y controles sin diluir en los pocillos adecuados de la placa de microtitulación, con una dilución final de 1:10.
- c. Se homogenizó el contenido de los pocillos mediante una breve y suave agitación de la placa.
- d. Se cubrió la placa de microtitulación con una tapa y se incubó durante 60 minutos a 37°C en una cámara húmeda.

3.7.3. Lavado de las placas de microtitulación

- a. Tras la incubación, se lavó las placas de microtitulación agitándolas enérgicamente para vaciar los pocillos y luego se llenó con 300 μ l de solución de lavado diluida CHEKIT, evitando la formación de burbujas de aire. Se repitió este paso dos veces más. Luego se vació las placas enérgicamente y se golpeo con firmeza sobre papel absorbente.

3.7.4. Dilución, distribución e incubación del conjugado

- a. Se dispensó 100 μ l de conjugado CHEKIT anti-porcino-IgG-PO en cada pocillo.
- b. Se cubrió e incubó la placa por 60 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- c. Se procedió a lavar la placa de microtitulación tal como se explicó en el punto 3.7.3.

3.7.5. Adición del sustrato TMB cromógeno

- a. Se dispensó 100 μ l de solución sustrato CHEKIT-TMB en cada pocillo, previamente atemperado a 25 °C. Se incubó el sustrato a temperatura ambiente (\pm 25°C) durante 15 minutos.

3.7.6. Lectura e interpretación de los resultados

- a. La reacción producida se detuvo dispensando 100 µl por pocillo de solución de frenado CHEKIT-TMB, a temperatura ambiente.
- b. La lectura de los resultados se realizó con un espectrofotómetro con una longitud de onda de 450 nm.
- c. La validación de la placa fue óptima, ya que la densidad óptica (DO) del control positivo no fue superior a 2.0 y la DO del negativo no excedió a 0.5, así como la diferencia entre ambos controles fue mayor a 0.3.
- d. El valor de cada muestra se calculó en relación al control negativo y positivo con la siguiente formula:

$$\text{Valor (\%)} = \frac{\text{DO}_{\text{muestra}} - \text{DO}_{\text{negativo}}}{\text{DO}_{\text{positivo}} - \text{DO}_{\text{negativo}}} \times 100\%$$

- e. Si el resultado fue mayor a 40% (0.4) la muestra se consideró positiva, si era menor a 30% (0.3) la muestra se consideró negativa. Si el resultado se encontraba entre el 30 y el 40% la muestra se consideró como dudosa.

3.8. Análisis de Datos

Se midió la concentración de anticuerpos, expresados por el cociente de DO de cada una de las muestras, para cada muestreo (destete, mitad y final de la etapa de recría). Los resultados obtenidos fueron ingresados a una base de datos y analizados mediante el programa estadístico SPSS. Se determinó la normalidad de los cocientes de DO por medio de la prueba Kolmogorov-Smirnov para una muestra. En el caso que la distribución sea normal, se utilizará la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para analizar si existe diferencia estadística significativa; y en caso que la distribución sea no normal, a cada uno de los valores del cociente se le realizará una transformación logarítmica (log10). En caso que los valores continúen con una distribución no normal, se utilizará la prueba de Kruskal-Wallis.

IV. RESULTADOS

De las 17 madres muestreadas en el presente trabajo, el 94.1% (16/17) fueron consideradas positivas a la presencia de anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae*, y el 5.9% (1/17) fue considerada como sospechosa (Apéndice 1).

Se analizaron los valores de los cocientes de DO para cada día de muestreo obteniéndose los resultados observados en el cuadro 1.

Por medio de la prueba Kolmogorov–Smirnov, se procedió a analizar los valores de los cocientes de DO obtenidos de los lechones, el cual dio como resultado que estos no seguían una distribución normal (Apéndice 7). Con estos datos se procedió a realizar la transformación logarítmica de la variable (\log_{10}). Después de la transformación se obtuvo una distribución normal en la variable de medición (Apéndice 8), procediéndose a realizar la prueba de ANOVA.

Se comprobó que existen diferencias entre el valor de los promedios de los cocientes de DO transformados para cada día de muestreo, siendo mayor el valor del promedio en el día 17 que en el día 42; y ésta a su vez mayor que en el día 73, lo cual además indica que conforme aumenta la edad de los animales el nivel de anticuerpos disminuye (Gráfico 1).

Por medio de la prueba de Tukey se analizaron las medias de los cocientes de DO transformados para cada día de muestreo (17, 42 y 73 días), observándose que existía

una diferencia estadística significativa entre los días 17 y 42, y entre los días 17 y 73 ($p=0.000$); sin embargo, entre los días 42 y 73 no hubo diferencia significativa ($p=0.416$) (Cuadro 2). Para efectos prácticos del estudio se utilizaron los valores obtenidos en el cuadro 1.

Cuadro 1. Valores obtenidos y analizados de los cocientes de DO para los anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos a los distintos días de muestreo (n= 30)

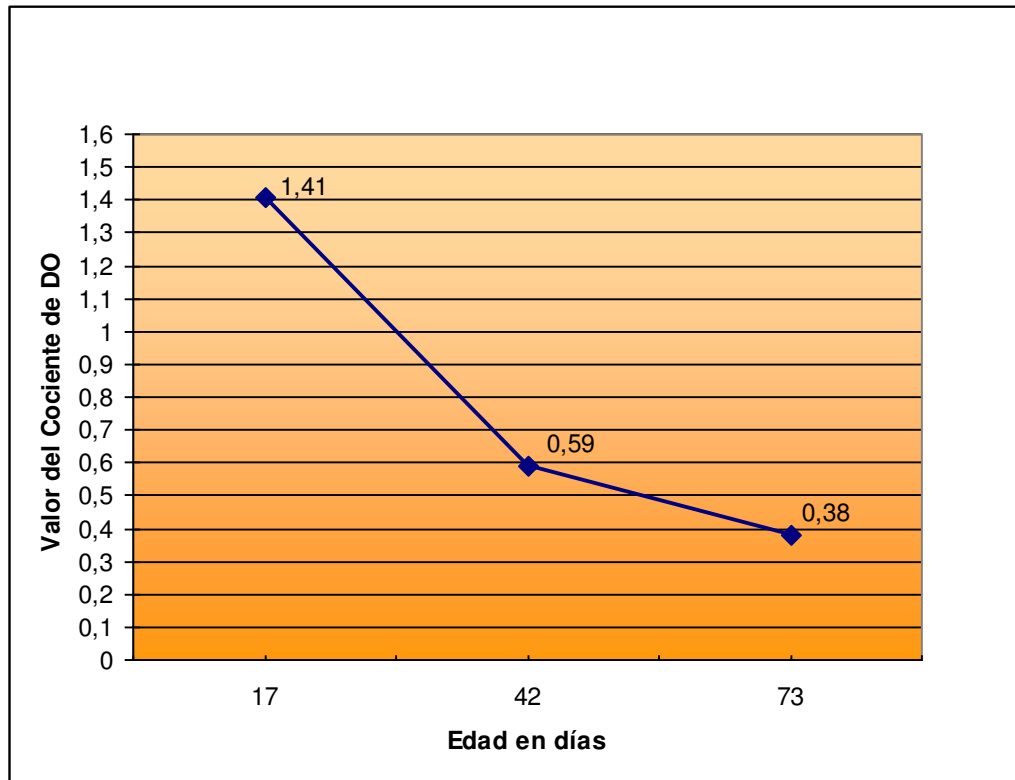
Días muestreados	Media	Desviación Estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo
17 días	1.41210	0.331943	0.732	1.914
42 días	0.59767	0.446486	0.138	1.476
73 días	0.38680	0.163502	0.099	0.739

Cuadro 2. Valores obtenidos y analizados de los cocientes de DO para los anticuerpos contra *Actinobacillus. pleuropneumoniae* en porcinos a los distintos días de muestreo después de su transformación logarítmica (n= 30)

Días muestreados	Media	Desviación Estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo
17 días	0.136657 ^a	0.1130746	-0.1355	0.2819
42 días	-0.364812 ^b	0.4204011	-1.6778	0.1691
73 días	-0.228161 ^b	0.2101998	-1.0044	-0.2819

ab. Diferentes letras indica diferencia entre las medias

Gráfico 1. Tendencia de los anticuerpos maternos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos para cada día de muestreo



Valor de cociente (VC) > 0.4= positivo (+), < 0.3= negativo (-), 0.4>VC>0.3= sospechoso

V. DISCUSION

En el presente estudio se analizó, mediante el uso de una prueba comercial de ELISA indirecto basado en la toxina ApxIV del *A. pleuropneumoniae*, la persistencia de los anticuerpos maternos en lechones provenientes de madres seropositivas a dicho agente en una granja tecnificada con un sistema todo dentro/todo fuera. Esto ha permitido evaluar el estado inmunitario de los lechones hasta el final de la etapa de recría, donde según la literatura, los animales suelen perder su inmunidad materna, haciéndolos susceptible durante la etapa de engorde.

En el Apéndice 1 se puede observar un alto número de madres positivas a la presencia de anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae*, lo cual demuestra la gran actividad del agente en el hato reproductor de esta unidad de producción, ya que se trata de madres a las cuales no se les ha realizado ninguna vacunación contra este agente. La no vacunación de las madres hace suponer que la inmunidad materna transferida a sus crías fue adquirida a partir de una infección natural, ya sea dentro de la granja o en un período anterior a su llegada. Es posible detectar en granjas con antecedentes de PCP en cerdos de engorde, la presencia de *A. pleuropneumoniae* en madres a nivel tonsilar que no presentan signos clínicos (Angen y Jessing, 2004). Este grupo de animales puede ser la fuente de infección a sus crías o a otros animales susceptibles dentro de la granja, siendo a su vez responsable de brotes explosivos dentro de ella (Chiers *et al.*, 2002)

Existe un gran porcentaje (100%) de lechones positivos a la presencia de anticuerpos contra el *A. pleuropneumoniae* que llegaron a la fase de destete (17 días), lo cual indica que la alta tasa de transferencia de la inmunidad materna vía el calostro hacia los lechones fue muy efectiva (Apéndice 3). Sin embargo puede observarse que la concentración de anticuerpos a los 17 días no es uniforme, con rangos del cociente de DO que van desde 0.73 a 1.914 (Apéndice 2). Vigre y col. (2003) mencionan que la ingesta inicial de anticuerpos calostrales no es homogénea en todos los lechones, mostrando diferencias en el nivel de anticuerpos a lo largo de la etapa de producción. Es posible encontrar diferencias en los niveles de anticuerpos entre individuos de diferentes camadas e incluso entre una misma camada. La diferencia entre camadas se podría explicar porque en las marranas el nivel de anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae* puede variar con el número de partos como lo encontró Zielinski y col.(2006), mientras que diferencias entre el nivel de anticuerpos entre hermanos de camada puede deberse a un mal manejo del lechón al nacimiento en lo que respecta a la ingestión del calostro, por lo tanto, el nivel y duración de los anticuerpos maternales son extremadamente variables entre individuos y hatos.

Concellón (1980) señala que cuando en marranas las infecciones son crónicas o subclínicas, se desarrolla una inmunidad reducida o baja, recibiendo sus lechones poca protección, siendo en estos casos la duración de la inmunidad escasa. Sin embargo, infecciones naturales a bajas dosis por parte de la madre también provee protección total o parcial a sus crías (Nechvatalova *et al.*, 2005). En nuestro estudio no se realizó diferenciación entre el número de partos a las madres muestreadas ya que solo se quería obtener lechones procedentes de madres positivas a *A. pleuropneumoniae*.

Tizard (1998) menciona las posibles causas que impiden una correcta ingestión inicial de calostro. Estas van desde partos prematuros donde existe una cantidad insuficiente de calostro disponible o esta es de mala calidad; así mismo por lactancia prematura y goteo excesivo de la glándula mamaria antes del parto, falla en la ingestión que ocurre en casos de partos múltiples donde la cantidad de calostro que produce la madre no aumenta en proporción al número de crías, esto debido al deficiente desempeño de la madre. La debilidad del neonato, el impulso débil de

succión o problemas físicos tales como tetillas defectuosas o anomalías mandibulares del lechón, así como deficiencia de la absorción intestinal son también causas de deficiencias en la ingesta del calostro. Un correcto manejo durante las primeras 24 horas post parto para tratar de controlar el consumo homogéneo del calostro por parte de todos los lechones resulta de suma importancia para el posterior estado sanitario de ellos.

A los 42 días, los animales mostraron un descenso en el nivel de los anticuerpos maternos en comparación con el día 17, siendo este descenso significativo. Además, los anticuerpos detectados pueden aún considerarse como provenientes de la inmunidad materna.

A los 73 días, el nivel de la concentración de anticuerpos continuó descendiendo (Gráfico 1), sin embargo, la diferencia entre los días 42 y 73 no fue significativa. Analizando estos últimos datos para cada animal, se pudo observar que el 20% (6/30) de animales pasan de ser negativos a positivos o sospechosos al final del día 73 (Apéndice 2). Esto puede dar a entender que tales animales, posiblemente durante el período mencionado, hallan seroconvertido ante la presencia del agente transmitido por la madre durante la etapa de lactación. Sin embargo, debido a nuestro diseño de estudio no se pudo determinar el momento exacto donde ocurrió la seroconversión, pero se puede deducir que esto ocurre entre la semana 6 y 8.

Se puede considerar que algunos animales posiblemente estén seroconvirtiendo durante la etapa de recría debido a que el nivel de anticuerpos maternos no es suficiente para prevenir la infección pulmonar. Vigre y col (2002) demostraron que el *A. pleuropneumoniae* puede estar presente en el tracto respiratorio superior (tonsilas) de lechones provenientes de madres seropositivas aún en presencia de anticuerpos maternos, ocurriendo esta colonización a partir de los 11 días; encontrándose además seroconversión entre las 2 y 4 semanas de haber sido detectado la infección. Los animales de nuestro estudio, al parecer, pudieron adquirir el agente proveniente de las madres durante los primeros días durante la etapa de lactación; estos mantuvieron al agente alojado a nivel de las tonsilas y de la cavidad nasal. Estos anticuerpos calostrales evitan la colonización pulmonar pero no la

colonización del tracto respiratorio superior. A medida que desaparecen los anticuerpos calostrales, el agente invade el epitelio alveolar produciéndose la reacción del sistema inmune del porcino comenzando la producción de los anticuerpos propios de la infección (Chiers *et al*, 2002). Sin embargo, estos animales no mostraron signos clínicos de la enfermedad hasta el último día de muestreo. La razón por la cual algunos lechones con similar nivel de anticuerpos calostrales no seroconvirtieron, podría ser debido a la variación biológica en la fuerza de la respuesta inmune humoral que existe entre individuos con igual estímulo antigénico (Stevenson, 1999)

Para el día 73 se observó un descenso en los niveles de anticuerpos en comparación a los demás días; sin embargo, se nos hace difícil discriminar los anticuerpos procedentes de la inmunidad calostrale de los procedentes de la infección, al menos no con el kit de ELISA utilizado. Pese a esto, puede decirse que los animales llegan al final de la etapa de recría con niveles mínimos de anticuerpos, convirtiéndolos en animales susceptibles cuando estos son trasladados a la zona de engorde, confirmando nuestra hipótesis. Esto coincide con hallazgos encontrados por Chiers y col. (2002), quien demostró que a la semana 12 los niveles de anticuerpos calostrales fueron mínimos, observándose el descenso a partir de la semana 8.

No solo el estado inmunitario de la población contribuye al desarrollo del *A. pleuropneumoniae*, sino que algunos factores ambientales también están involucrados. Debemos recordar que el período donde los animales pierden su inmunidad materna varía entre las 2 y 8 semanas, incluso hasta la semana 12; determinándose para nuestro estudio el período crítico la semana 10, debido a que coincidía con la finalización de la etapa de recría y su posterior traslado a la zona de engorde.

El proceso de traslado de estos animales a la zona de engorde produce grados de estrés en estos animales, no solo por el movimiento y cambio de ambiente, sino por el reagrupamiento de los animales de acuerdo al tamaño y al sexo. Además, durante esta etapa se produce un alto consumo de alimento por parte de estos animales, lo que conlleva a una mayor eliminación de desechos orgánicos que originan un

aumento en la concentración de gases (amoníaco, sulfuro de hidrógeno), los cuales son muy difíciles de eliminar en ambientes con ventilación natural, trayendo como consecuencia una disminución del mecanismo de defensa del tracto respiratorio a favor del agente patógeno. A su vez, el crecimiento y aumento en la ganancia diaria de peso del animal hace que se disminuya el área por animal y por lo tanto el volumen de aire por kilogramo de peso vivo, lo que representa un valor importante en la presentación de problemas respiratorios en porcinos criados en confinamiento. Todos estos factores sumados al descenso de la inmunidad materna conlleva una actividad más intensa del *A. pleuropneumoniae*, pudiendo o no producir enfermedad clínica, dependiendo esto a su vez del número de microorganismos eliminados (presión de infección) y el o los serotipos actuantes.

La ausencia de signos clínicos relacionado a PCP en la etapa de engorde en esta granja nos hace suponer que a pesar que pudiera existir una profusa transmisión del *A. pleuropneumoniae* de la madre al lechón durante la lactancia, ésta no alcanza para producir una infección con signos clínicos debido a la inmunidad materna conferida y al control de los factores ambientales y de manejo mencionados antes. La granja en estudio lleva a cabo practicas de manejo adecuadas, tales como la implementación del sistema “todo dentro/todo fuera” (con lo cual se puede asegurar que ningún otro animal haya ingresado a este grupo luego del destete), así como prácticas de limpieza y desinfección de cada unidad (comprendida entre los programas de bioseguridad) y carga animal adecuada, lo cual minimizaría la incidencia de PCP durante la etapa de engorde. Es posible también que ésta granja posea serotipos menos virulentos los cuales no llegan a producir signos clínicos de la enfermedad (Vaz, 2002), o estas se vean enmascarados con otros problemas respiratorios presentes en ella, tales como la neumonía enzoótica producida por el *Mycoplasma hyopneumoniae*. Chiers (2004), mencionó que el *A. pleuropneumoniae* puede actuar como patógeno secundario después de una infección viral o por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

El uso de vacunas nos podría dar una mayor protección a los lechones, siendo para este efecto la determinación del momento exacto de la aplicación de la vacuna un factor importante ya que los anticuerpos calostrales interfieren con los productos incluidos en la vacuna. Además, la estabilización de la inmunidad de los lechones,

por medio de la vacunación de las madres, nos puede permitir que la duración de la inmunidad materna brindada a sus crías alcance más allá de las cuatro semanas en promedio (Utrera *et al.*, 2002), permitiendo a su vez que madres con diferentes números de partos posean un mismo nivel de inmunidad.

Los factores ambientales, tales como problemas de ventilación, se pueden mejorar mediante la eficiencia de los sistemas de ventilación natural por medio de un buen manejo de cortinas, sumada a una buena limpieza y eliminación de las heces y orina. El estrés producido por el traslado y reagrupamiento de los animales durante el engorde podrían evitarse en parte mediante el buen manejo de estos durante la etapa de recría, lo cual conduciría a la reducción de la variación del peso vivo de los animales, pudiéndose conservar a este grupo formado en la recría y reduciendo así el estrés por reagrupamiento.

Por lo tanto, manteniendo un nivel de inmunidad elevada al comienzo de la etapa de engorde y minimizando los factores ambientales y estresantes a los cuales está envuelto los animales en esta etapa, se podría mantener a la población animal en niveles estables evitando la aparición de brotes de la enfermedad dentro de ella.

VI. CONCLUSIONES

- Los animales procedentes de madres seropositivas a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, llegan a la etapa de engorde con niveles muy bajos de anticuerpos.
- Existe desuniformidad en cuanto a los niveles de anticuerpos al final de la etapa de lactación, influyendo en el estado sanitario posterior.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar un correcto manejo de los lechones al parto que facilite la correcta ingestión del calostro dentro de las primeras 24 horas de vida.
- Mantener un correcto manejo de los animales en la etapa de recría que permita mantener al grupo formado durante ésta etapa, evitando situaciones de estrés por reagrupamiento en la etapa de engorde.
- Verificar el buen manejo de la calidad ambiental durante la etapa de engorde mediante una correcta ventilación, buena limpieza y eliminación de heces y orina, y verificando que las condiciones de temperatura y humedad sean adecuadas.
- Se debería determinar el serotipo o serotipos presentes en la granja para establecer si estos son patógenos o no, y evitar que el ingreso de otros serotipos desencadenen cuadros clínicos dentro de ella.
- De ser necesario, realizar un monitoreo serológico dentro de la granja para establecer un correcto plan vacunal, tanto a madres como a su descendencia.

VIII. LITERATURA CITADA

1. **Angen, Ø.; P.M.H. Heegaard; D.T. Lavritsen; V. Sorensen. 2001.** Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 by immunomagnetic separation. Vet. Microbiol. 79:19-29.
2. **Angen, Ø.; S. Jessing. 2004.** PCR test for serotype specific identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Proc. 18th IPVS Congress. Vol 1. Hamburg-Germany. p 161.
3. **Baarsch, M.J.; R.W. Scamurra; K. Burger; D.L. Foss; S.K. Maheswaran; M.P. Murtaugh. 1995.** Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infected. Immun. 63(9): 3587-3594.
4. **Baltes, N. 2002.** The role of iron in *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection: Identification and *in vivo* characterization of virulence-associated genes. Memoria de doctorado en ciencias. School of Veterinary Medicine Hannover. Hannover. Disponible en: http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/baltesn_2002.html.
5. **Batista, L.; A. Broes; R. Desrosiers; S. Lacouture; S. D'Allaire; M. Gottschalk. 2006.** Use of serology on colostrums samples for monitoring *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine

Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infections in sow herds. Proc. 19th IPVS Congress. Vol.1. Copenhagen-Denmark. p 197.

6. **Beaudet R.; G. McSween; G. Boulay; P. Rousseau; J.G. Bisailon; J.P. Descoteaux; R. Ruppanner. 1994.** Protection of mice and swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination. Vet. Microbiol. 39:71–81.
7. **Bersano, J.G.; E.M.C. Villalobos; R.M. Monteiro. 2003.** Prevalência do *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* em suínos no Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo. 70:251-253.
8. **Blackall, P.; H. Klaasen; H. Van Den Bosch; P. Kuhnert; J. Frey. 2002.** Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. Vet. Microb. 84: 47-52.
9. **Bossé, J.T.; R.P. Johnson; M. Nemeč; S. Rosendal. 1992.** Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Infect. Immun. 60(2):479-484.
10. **Bossé, J.T.; H. Janson; B. Sheehan; A. Beddek; A. Rycroft; J. Simon; P. Langford. 2002.** *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Pathobiology and pathogenesis of infection. Mic. & Inf. 4:225-235.
11. **Calle, S.; C. Camacho; L. Arteaga. 1996.** Detección de anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas porcinas en Lima. XIII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Lima-Perú. p 231.
12. **Castillo, C. 1996.** Aislamiento y determinación de serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos beneficiados en camal de Lima. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Univ. Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque. 38p.

13. **Chiers, K.; I. Van Overbeke; E. Donne; M. Baele; R. Ducatelle; T. De Baere; F. Haesebrouck. 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.* 83(2):147-159.
14. **Chiers, K.; E. Donné; I. Van Overbeke; R. Ducatelle; F. Haesebrouck. 2002.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infections patterns and serological profiles. *Vet. Mic.* 85: 343-352.
15. **Chiers, K. 2004.** Detection of pigs carrying *Actinobacillus pleuropneumoniae* in their upper respiratory tract using polymerase chain reaction. PhD Thesis. University of Gent, Gent. Belgium.
16. **Cho, W.; C. Chae. 2001(a).** Expression of the *apxIV* gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Comp. Path.* 125:34-40.
17. **Cho, W.; C. Chae. 2001(b).** Genotypic prevalence of *apxIV* in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13:175-177.
18. **Cho W.; C. Choi; C. Chae. 2002.** *In situ* hybridization for the detection of *apxIV* gene in the lungs of pigs experimentally infected with twelve *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Vet. Res.* 33:653-660.
19. **Coelho, A.C.; F.J. Vieira-Brito; M.G. Vieira-Brito; J. Rodrigues. 2004.** Pleuroneumonía suína causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*-diagnóstico e estratégias de controlo. *Rev. Port. Cienc. Vet.* 99(552): 193-198.
20. **Concellón, A. 1980.** La cerda y su camada. 2da. ed. p 169-176. Ed. Aedors Barcelona.
21. **Costa, M.M. 2004.** Aspectos fenotípicos, genotípicos e de diagnóstico da bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Ciência Rural.* 34(4): 1305-1313.

22. **Costerton, J.W., P.S. Stewart; E.P. Greenberg. 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284:1318-1322.
23. **Cruijsen, T.; L.A. van Leengoed; M. Ham-Hoffies; J.H. Verheijden. 1995.** Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. *Infect. Immun.*63: 2341–2343.
24. **Delventhal, S.; A. Hensel; K. Petzoldt y R. Pabst. 1992.** Cellular changes in the bronchoalveolar lavage (BAL) of pigs, following immunization by the enteral or respiratory route. *Clin. Exp. Immunol.* 90: 223-227.
25. **Dreyfus, A.; A. Schaller; S. Nivollet; R.P.A.M. 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.
26. **Dubreuil, J. D.; M. Jacques; K. R. Mittal; M. Gottschalk. 2000.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim. Health Res. Rev.* 1:73-93.
27. **Duff, J.P.; W.A. Scott; M.K. Wilkes; B. Hunt. 1996.** Otitis in a weaned pig: a new pathobiological role for *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Vet. Rec* 139:561-563.
28. **Enøe, C.; S. Andersen; V. Sørensen; P. Willeberg. 2001.** Estimation of sensitivity, specificity and predictive values of two serologic tests for the detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in the absence of a reference test (gold standard). *Prev. Vet. Med.* 51(3-4):227-43.
29. **Frey J. 1995.** Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* 3: 257–261.

30. **Gottschalk, M.; A. Broes; N. Fittipaldi. 2003.** Recientes descubrimientos sobre el *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Anaporc. 23(237):37-53.
31. **Gottschalk, M. 2004.** Tendencias actuales en el control de la pleuroneumonía porcina. Mundo Ganadero. 15(170):34-39.
32. **Gottschalk, M; H. Morvan; A. Broes; R. Desrosiers; M. Kobisch. 2005.** Actualités sur la pleuropneumonie porcine. J. Rech. Porc. 37: 341-346.
33. **Gutiérrez, C.; V. de la Puente; E. Rodríguez Ferri. 2002.** Géneros *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella* y *Mannheimia*. En: Manual de microbiología veterinaria. Cap. 25. S. Vadillo *et al.*(ed.). Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
34. **Hammer-Barrera, R.; D. Godínez; V.I. Enríquez; S. Vaca-Pacheco; R. Martínez-Zúñiga; P. Talamas-Rohana; F. Suárez-Guemez; F. de la Garza. 2004.** Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. Can. J. Vet. Res. 68(1):33-41.
35. **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. Microbiol. 58:239-249.
36. **Huang, H.; R. Zhou; H. Fan; H. Dan; M. Chen; L. Yan; W. Bei; H. Chen. 2006.** Generation of monoclonal antibodies and epitope mapping of ApxIVA of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Molec. Immun. 43:2130-2134.
37. **Jacques, M. 2004.** Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can. J. Vet. Res. 68:81–85.
38. **Jeannotte, M.E.; M. Abul-Milh; J.D. Dubreuil; M. Jacques. 2003.** Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to phosphatidylethanolamine. Infect. Immun. 71(8):4657-4663.

39. **Jensen, T.K.; M. Boye; T. Hagedorn-Olsen; H.J. Ritsing; Ø. Angen. 1999.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* osteomyelitis in pigs demonstrated by fluorescent *in situ* hybridization. Vet. Pathol. 36:258:261.
40. **Jessing, S.; Ø. Angen, T.J. Inzana. 2003.** Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5 and 6. J. Clin. Micro. 41:4095-4100.
41. **Jobert, J.L.; C. Savoye; R. Cariolet; M. Kobisch; F. Madec. 2002.** Experimental aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to pigs. Can. J. Vet. Res. 64:21-26.
42. **Kaplan, J.B.; M.H. Mulks. 2005.** Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. Microbiol. 108:89-94.
43. **Klein, C.S.; I.A. Piffer; S. Ceroni da Silva; A. Schrank; M.B. Favero; I.S. Schrank. 2003.** Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR on field strains from healthy and diseased pigs. Curr. Microbiol. 46(6):443-447.
44. **Krejci, J.; K. Nechvatalova; H. Kudlackova; M. Faldyna; Z. Kucerova; M. Toman. 2005.** Systemic and Local Antibody Responses after Experimental Infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Piglets with Passive or Active Immunity. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. 52 (4):190–196.
45. **Kristensen, C.S.; Ø. Angen; M. Andreassen; H. Takai; J.P. Nielsen; S.E. Jorsal. 2004.** Demonstration of airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 between simulated pig units located at close range. Vet. Micro. 98:243-249.
46. **Leman, A.D.; B. Straw. 1986.** Diseases of Swine. 6^a ed. p. 44-57. Iowa State University Press. Ames. Iowa.

47. **Machado, H.; I. Piffer; A. Guidoni; C. Klein; C. Gil-Turnes. 2001.** Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico sorológico de infecções pelos sorotipos 3, 5 e 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53(5):513-522.
48. **Madsen LW; M. Boye; T.K. Jensen; B. Svensmark. 2001.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* demonstrated in situ in exudative meningitis and nephritis. Vet. Rec. 149(24):746-747.
49. **Maldonado, J.; P. Riera; E. Martínez; D. Llopart; C.R. Osorio; C. Artigas. 2004.** NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* implicated in the etiology of fatal swine pleuropneumonia. Proc. 18th IPVS. Vol I. Congress. Hamburg- Germany. p 159.
50. **Marsteller, T.A.; Fenwick, B. 1999.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. Swine Health. Prod. 7:161-165.
51. **Medrano, A. 2003.** Expresión recombinante en *Escherichia coli* de antígenos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* para vacunación y diagnóstico. Memoria de doctorado en ciencias. Institut de Biotecnología i Biomedicina, Univ. Autònoma de Barcelona. Barcelona. 135p.
52. **Nechvatalova, K.; J. Krejci; H. Kudlackova; M. Toman. 2004.** Diagnostic relevante of detection of antibody response to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in piglets. Proc. 18th IPVS Congress. Vol 1. Hamburg-Germany. p 422.
53. **Nechvatalova, K.; P. Knotigova; J. Krejci; M. Faldyna; E. Gopfert; P. Satran; M. Toman. 2005.** Significance of different types and levels of antigen-specific immunity to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in piglets. Vet. Med. 50(2):47-59.

54. **Negrete-Abascal, E.; M. Reyes; R. García; S. Vaca; J. Girón; O. García; E. Zenteno; M. de la Garza. 2003.** Flagella and motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Bacteriol. 185(2): 664-668.
55. **Negrete-Abascal, E.; R. García, M. Reyes, D. Godínez, M. de la Garza. 2000.** Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. FEMS Microb. Letters. 191(1):109–113.
56. **Nicolet, J. 1992.** *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En: Disease of swine. Leman, A.D.; B. Straw; W.L. Mengeling; S. D’Allaire; D.J. Tayllor (eds.). p 401-408. Ames. Iowa State University Press.
57. **Oishi, E.; I. Hiroya; T. Okabe; N. T&Terakodo. 1993.** Passive protection of mice against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection by monoclonal antibodies. J. Vet. Med. Sci. 55(5):711-715.
58. **Palomo, A. 2006.** Pleuroneumonía porcina. Av. Tecnol. Porc. 3(1):27-32.
59. **Piffer, I.; J. Feitosa. 1993.** Pneumonia en suínos. Suinocultura Dinâmica. 2(8):1-5.
60. **Pohl, S.; H.U Bertschinger; W. Frederiksen; W. Mannheim. 1983.** Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int J. Syst. Bacteriol. 33: 510–514.
61. **Radostis, O; C. Gray; D. Blood; K. Hinchcliff. 2002.** Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª ed. p. 1064-1071. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
62. **Rodríguez-Ferri, E.F. 2002.** Caracterización y prevalencia de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en España. Anaporc. 219:5-51.

63. **Rodríguez-Ferri, E.F.; J. Barceló; S. Gómez; J. Sánchez-Viscaíno. 2002(a).** *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas. Disponible en: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/6/6-actinoba.htm>.
64. **Rodríguez-Ferri, E.F.; C. Gutiérrez; V. de la Puente; N. García; J.L. Monter; M.L. del Río; N. García; M. Blanco; J. Navasi; N. Ladrón. 2002(b).** Pleuroneumonía porcina. *Inf. Vet.* 234: 35-44.
65. **Rosales, C. 2005.** Pleuroneumonía porcina: Impacto económico de la enfermedad. 1º Symposium Internacional de Nutrición y Sanidad Porcina. Lima, Perú. p 114-120.
66. **Rycroft, A.; L. Garside. 2000.** *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *Vet. J.* 159:18-36.
67. **Schaller, A.; R. Kuhnert; J. Nicolet; T.J. Anderson; J.I. MacInnes, R.P.A.M. Segers; J. Frey. 1999.** Characterization of *apxIVA*, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology.* 145:2105-2116.
68. **Schaller, A.; S.P. Djordjevic; G.J. Eamens; W.A. Forbes; R. Kuhn; P. Kunhert; M. Gottschalk; J. Nicolet; J. Frey; 2001.** Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. *Vet. Micro.* 79:47-62.
69. **Schaller, A.; S. Nivollet; A. Dreyfus; J. Frey; L. Schalch. 2003.** Serodiagnosis of swine pleuropneumonia with an ELISA based on the specific RTX toxin ApxIV of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Proc. 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology. Bangkok-Thailand. p O17.

70. **Sjölund, M.; M. Zoric; M. Persson; P. Wallgren. 2004.** Maternal protection to infections caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* effects of the immune status of the dam. Proc. 18th IPVS Congress. Vol 1. Hamburg-Germany. p 409.
71. **Stevenson, G.W. 1999.** Common mistakes in interpretation of population serology. Proc. American Association of Swine Practitioners. p 339-343. St. Louis, USA.
72. **Taylor, D. J. 1999.** *Actinobacillus pleuropneumoniae*. p. 343-354. En: B.E. Straw; S. D'Allaire; W.I. Mengeling; D.J. Taylor (eds.). Diseases of swine. 8^{va} ed. Iowa State University Press. Ames.
73. **Thacker, B. 1997.** La enfermedad respiratoria porcina: un desafío constante a la rentabilidad de la producción. Anaporc. 170:44-62.
74. **Tizard, I. 1998.** Inmunología Veterinaria. 5^a ed. p 193-207, 255-265, 345-352. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México.
75. **Utrera, V.; A. Gallardo; L. Mariño. 1988.** Serotipificación de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. Vet. Trop. 13:43-54.
76. **Utrera, V.; C. Pijoan. 1991.** Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. Vet Rec. 128: 357-358.
77. **Utrera, V.; E. Sorbe; J. Villalobos; L. Rausseo, J.P. Cano; D. Fuentes. 2002.** Efecto de la estabilización de la inmunidad de las cerdas reproductoras sobre la eficacia de programas de vacunación contra la pleuroneumonía porcina. Rev. Científica. 12(2):137-142.
78. **Utrera, V.; S. Del Castillo. 2006.** Pleuroneumonía porcina. ¿Un enemigo fácil de derrotar?. Disponible en: http://www.ergomix.com/pleuroneumonia_porcina_un_enemigo_s_articulos_1314_POR.htm.

79. *van Leengoed, L. 1993.* Pathogenesis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections. *Comp. Haem. Int.* 3(4):245-246.
80. *Vaz, C.S.L. 2002.* Genotipificação de amostras sorotipificáveis e não sorotipificáveis de *Actinobacillus pleuropneumoniae* através de RAPD. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Univ. Federal do Rio Grande do Sul. 122p.
81. *Vaz, C.S.L.; S.C. da Silva. 2004.* Aspectos recentes da patogênese e diagnóstico da pleuropneumonia suína. *Ciencia Rural.* 34(2):635-643.
82. *Vigré, H.; Ø. Angen; K. Barfod; D.T. Lavritsen; V. Sorensen. 2002.* Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies. *Vet. Mic.* 89: 151-159.
83. *Vigré, H.; A.K. Ersboll; V. Sorensen. 2003.* Decay of acquired colostral antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *J. Vet. Med. B.* 50:430-435.
84. *Wallgren, P.; M. Sjölund; M. Person; M. Zoric; G. Karlsson. 2004.* Spread of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* in a pig herd chronically affected by respiratory disorders. *Proc. 18th IPVS Congress.* Vol 1. Hamburg-Germany. p 160.
85. *Zielinski, G.; Estévez, A.; Rufo, M. 2006.* Dinámica de la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en una granja sin sintomatología clínica. *Proc. Vº Congreso de Producción Porcina del Mercosur.* Cordoba-Argentina. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar>
86. *Zielinski, G. 2006.* Infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae*: situación en Argentina. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/MJUAREZ/info/documentos/sanidad_animal/actinobacillus06.htm.

IX. APENDICES

APENDICE 1

Resultados del análisis serológico realizado por la prueba de ELISA contra la toxina ApxIV a las madres un mes antes del parto

Número	Identificación	Nº Parto	Cociente de DO	Resultado
1	1386	1	0.304	Sospechoso
2	1379	1	0.692	Positivo
3	1309	2	1.055	Positivo
4	1275	2	1.191	Positivo
5	1331	2	1.569	Positivo
6	1317	2	0.819	Positivo
7	1206	3	1.484	Positivo
8	1222	3	1.956	Positivo
9	1148	3	1.791	Positivo
10	1219	3	1.945	Positivo
11	1129	3	1.777	Positivo
12	1172	3	2.015	Positivo
13	1023	4	1.516	Positivo
14	942	5	2.228	Positivo
15	951	5	1.331	Positivo
16	944	5	1.759	Positivo
17	656	8	1.791	Positivo

APENDICE 2

Resultados serológicos obtenidos mediante la prueba de ELISA contra ApxIV en lechones a los 17, 42 y 73 días de muestreo

17 días			
N°	D.O.	COCIENTE	RESULTADO
01	2.448	1.301	+
02	2.770	1.491	+
03	2.165	1.133	+
04	1.540	0.763	+
05	2.475	1.317	+
06	2.820	1.521	+
07	2.790	1.503	+
08	3.331	1.823	+
09	3.434	1.884	+
10	3.485	1.914	+
11	3.099	1.686	+
12	2.917	1.578	+
13	2.930	1.586	+
14	3.484	1.914	+
15	2.979	1.615	+
16	2.381	1.261	+
17	2.399	1.272	+
18	3.375	1.849	+
19	2.490	1.326	+
20	1.805	0.920	+
21	1.488	0.732	+
22	1.737	0.880	+
23	2.758	1.484	+
24	2.991	1.622	+
25	2.930	1.586	+
26	3.013	1.635	+
27	2.452	1.303	+
28	2.320	1.225	+
29	2.211	1.160	+
30	2.073	1.079	+

+: positivo
 -: negativo
 S: sospechoso

APENDICE 2 (Continuación)

42 días			
N°	D.O.	COCIENTE	RESULTADO
01	0.791	0.410	+
02	1.392	0.903	+
03	0.527	0.194	-
04	0.777	0.399	S
05	1.614	1.085	+
06	1.485	0.979	+
07	0.651	0.295	-
08	1.004	0.585	+
09	0.487	0.161	-
10	1.468	0.966	+
11	0.657	0.300	S
12	0.555	0.217	-
13	0.933	0.527	+
14	1.514	1.003	+
15	1.404	0.913	+
16	0.595	0.249	-
17	1.749	1.196	+
18	0.618	0.268	-
19	1.081	0.648	+
20	0.123	0.138	-
21	0.415	0.102	-
22	0.265	0.021	-
23	0.504	0.175	-
24	1.591	1.066	+
25	1.489	0.983	+
26	0.628	0.276	-
27	1.555	1.037	+
28	2.09	1.476	+
29	2.011	1.411	+
30	0.614	0.265	-

+: positivo
 -: negativo
 S: sospechoso

APENDICE 2 (Continuación)

73 días			
N°	D.O.	COCIENTE	RESULTADO
01	0.805	0.352	S
02	1.029	0.533	+
03	0.562	0.156	-
04	0.632	0.212	-
05	0.99	0.502	+
06	0.922	0.447	+
07	0.68	0.251	-
08	0.82	0.364	S
09	0.747	0.305	S
10	1.197	0.669	+
11	0.622	0.204	-
12	0.835	0.376	S
13	0.747	0.305	S
14	0.964	0.481	+
15	1.078	0.573	+
16	0.706	0.272	-
17	0.981	0.494	+
18	0.819	0.363	S
19	0.992	0.503	+
20	0.491	0.099	-
21	0.554	0.149	-
22	0.753	0.310	S
23	0.815	0.360	S
24	1.001	0.511	-
25	0.869	0.404	S
26	0.907	0.435	+
27	0.814	0.359	S
28	1.284	0.739	+
29	1.227	0.693	+
30	0.595	0.183	-

+: positivo
 -: negativo
 S: sospechoso

APENDICE 3

Porcentaje y número de animales positivos, negativos y sospechosos a la prueba de ELISA contra la toxina ApxIV en los diferentes días de

	17 días		42 días		73 días	
	N°	%	N°	%	N°	%
Positivos	30	100	16	53.3	12	40
Negativos	0	0	12	40	8	26.6
Dudosos	0	0	2	6.6	10	33.3
TOTAL	30	100	30	100	30	100

APENDICE 4

Comparación de las medias de cocientes de DO de los diferentes días de muestreo

① Muestra (I)		② Muestra (J)	Diferencia de promedios (I-J)	Sig.
17 días	42 días		0.501469	0.000
	73 días		0.592986	0.000
42 días	17 días		-0.501469	0.000
	73 días		0.091517	0.416
73 días	17 días		-0.592986	0.000
	42 días		-0.091517	0.416

p<0.05= estadísticamente significativo

APENDICE 5

Análisis de los cocientes de la DO mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		COCIENTE
N		90
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.80239
	Std. Deviation	.549082
Most Extreme Differences	Absolute	.155
	Positive	.155
	Negative	-.089
Kolmogorov-Smirnov Z		1.469
Asymp. Sig. (2-tailed)		.027

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

APENDICE 6

Análisis de los cocientes de la DO después de su transformación logarítmica mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		TRANSF
N		90
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	-.228161
	Std. Deviation	.3806010
Most Extreme Differences	Absolute	.119
	Positive	.090
	Negative	-.119
Kolmogorov-Smirnov Z		1.133
Asymp. Sig. (2-tailed)		.154

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.