

## *Actinobacillus pleuropneumoniae.* Epidemiología y Diagnóstico

Elias F. Rodriguez Ferri  
Departamento de Sanidad Animal  
Universidad de León  
Zaragoza, Jornada Técnica AVPA. Abril, 2008

### Pleuroneumonía porcina

Enfermedad infecciosa del cerdo, producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, caracterizada por cuadros de neumonía necrótica hemorrágica, pleuritis y abundante presencia de adherencias fibrinosas con las paredes costales y el pericardio  
Alta mortalidad o crónica

### IMPACTO

- Una de las enfermedades de mayor impacto de entre las asociadas al Complejo Respiratorio Porcino
- Entidad independiente y asociaciones con otros microorganismos (bacterias: mycoplasmas y virus: PRRS)
- En USA, recientemente, 53 M anuales de pérdidas por esta causa
- Intensa investigación en los últimos años aunque siguen sin reconocerse FV *in vivo*, que justifiquen la totalidad del cuadro clínico, ni se ha resuelto la prevención vacunal completa

- *A. pleuropneumoniae* (App)
  - Morfología y estructura
  - NAD dependiente (necesita una fuente de piridin nucleótido) y algunos independientes: dos biotipos (I y II)
  - Cultivo en microaerofilia (5-10% de CO<sub>2</sub>) inicial. Medios convenientes. Estrategias
  - Caracteres importantes →

Hemolisis, Manitol, Xilosa, Fosfatasa, Ureasa,  $\beta$ -galactosidasa, Oxidasa




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

- Biotipos I (dependiente de NAD) y II (independiente de NAD)
- Serotipos K (:O)
- 15 serotipos (1-15)
  - en 2, 4, 7, 9 y 12 coexisten cepas del biotipo I y II
  - 13 y 14 son biotipo II
  - Resto (1,3,5,6,8,10,11 y 15) son biotipo I
  - Subtipos A y B en serotipos 1 y 5
- Tipificación por aglutinación, coaglutinación, hemaglutinación indirecta....
- Reacciones cruzadas (LPS y OMP) entre 1, 9 y 11; 3, 6, 8 y 15; 4 y 7
- Todos producen pleuroneumonía. Algunas cepas son más virulentas: 1, 5, 9, 10 y 11

**SEROTIPIFICACIÓN  
TIPIFICACIÓN ANTIGÉNICA**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### TOXINAS RTX (Apx)

- 3 tipos *in vitro*: Apx-I, -II y -III. Apx-IV sólo *in vivo* y es específica de App
- Máxima expresión al final fase logarítmica y principio estacionaria
- Actividad variable:
  - Apx-I es la más hemolítica y citotóxica (105-110 kDa)
  - Apx-II es menos hemolítica que Apx I y citotóxica (103-105 kDa)
  - Apx-III es la más citotóxica (120 kDa)
- Todas → daño pulmonar y antifagocíticas (invasión)
- Citotóxicas frente a eritrocitos, LF,  $\phi$  alveolares y PMN
- Bajas concentraciones interfieren con la función de  $\phi$ , PMN y células epiteliales (alvéolos)
- Todos los serotipos producen al menos 2 (-IV + ?). Nunca todas a la vez
- Los que producen Apx-I o los que producen 2 Apx son más virulentos.

**FACTORES DE VIRULENCIA**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

En cualquier caso, la definición de la virulencia de **App** no se puede aplicar de modo general sobre la base exclusiva de las toxinas RTX. Ejemplos

- **Serotipo 2 (II+III+IV):** descritas cepas **muy** virulentas en Francia y **poco** en USA
- **Serotipo 3 (III+IV):** Baja virulencia en la mayoría de países, pero **virulento** en UK
- **Serotipo 4 (II+III+IV):** En Canadá, **poco** virulento (portadores). En España, **muy** virulento
- **Serotipo 15 (II+III+IV):** **Virulento** en Australia, pero **poco** en Canadá, USA, Brasil y Argentina

### FACTORES DE VIRULENCIA (CÁPSULA)

- En todos los serotipos, de composición polisacáridica y estructura única.
- Protege frente al hospedador: resistencia frente al complemento y fagocitosis
- Induce Ac (IgA e IgG) en secreción respiratoria y suero
- Directamente no causa lesión ni es tóxica.
- Diferencias en virulencia se relacionan con espesor de la cápsula
- Mutantes acapsulados son avirulentos y se eliminan fácil por defensas. Cuestionada recientemente. Algunos mutantes acapsulados se adhieren a la tráquea y resisten al complemento.

### FACTORES DE VIRULENCIA (LIPOPOLISACÁRIDO)



- Estructura convencional.
- Inmunológicamente dominante. Induce Ac IgA en secreción respiratoria e IgG en suero
- Pérdida total o parcial ↓ variación liso - rugoso.
- Endotoxina, adherencia y colonización, respuesta inflamatoria en patogénesis (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8) → daño tisular y signos clínicos asociados
- Adherencia a células de la mucosa nasal, criptas de las tonsillas, tráquea y bronquiolos terminales y alvéolos
- Intensifica reacciones causadas por toxinas RTX.
- Inhibido por anticuerpos específicos.
- Unión a hemoglobina y captación de hierro.
- Mediación de la resistencia al complemento.

### FACTORES DE VIRULENCIA (PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA, OMPs)

- De unión a transferrina sérica porcina (TbpA y TbpB) para la captación de hierro.
- Experimentalmente, capacidad para sobrevivir con transferrina sérica porcina como única fuente de hierro:
  - causa posible de la especificidad por el cerdo
- Proteínas de unión a hemoglobina.
- Una proteína de unión al colágeno del pulmón. Más evidente en los serotipos 1 y 7
- OmlA: lipoproteína, 40-44 kDa (s/ser). Inmunidad de serotipo

---

---

---

---

---

---

---

### UREASA

- Fuertemente activa. Colonización
- Bloquea la muerte de las bacterias ingeridas en los fagocitos **inhibiendo la fusión fagosoma-lisosoma**, elevando el **pH** dentro del fagolisosoma. Ello **se opone al 'aclaramiento'** de la bacteria desde el tracto respiratorio superior, lo que **facilita la condición de portador**

---

---

---

---

---

---

---

### OTROS FACTORES DE VIRULENCIA

- **Plásmidos de Resistencia.**
  - Contiene plásmidos R que inducen R frente a sulfonamidas, tetraciclina y penicilina G
- **Sin caracterizar completamente:**
  - **fimbrias y pilis.** Al M/E, adherencia y colonización, se pierden por subcultivo. En sanos o subclínicos, en localización nasal o tonsillas
  - **proteína HlyX**
  - **proteasas**
  - **superóxido dismutasa**

---

---

---

---

---

---

---

## PATOGENESIS

- Coloniza las tonsillas y se adhiere al epitelio alveolar por unión a fosfolípidos (Ag O del LPS; AcM inhiben). Puede formar biofilms
- En el pulmón es fagocitado por  $\phi$  alveolares. Cápsula protege. Concentraciones suficientes secretan toxinas y matan  $\phi$ , células endoteliales, epiteliales y neutrófilos. Respuesta inflamatoria: **IL-1 $\beta$ , IL-8 y TNF- $\alpha$** .
- Lesiones comienzan 3-5 h postinfección (congestión y edema alveolar): formas agudas y sobreagudas. Se acumulan neutrófilos, fibrina, trombosis e infartos. Lesión evoluciona y necrótica (formas subagudas y crónicas)

---



---



---



---



---



---



---

## EPIDEMIOLOGIA

- El cerdo es el único hospedador natural**
  - En condiciones experimentales, el ratón es modelo de la enfermedad aguda (se aclara a las 48h). Inoculando Tf porcina se prolonga la supervivencia 15 días
- Localización respiratoria:**
  - Pulmones, tonsillas y fosas nasales. Diferentes serotipos pueden colonizar, a la vez, las tonsillas de un mismo animal (en una explotación pueden coexistir varios serotipos; se han descrito hasta 6 serotipos en un único cuadro clínico de campo)
  - En la enfermedad clínica se localiza en las lesiones y se libera en descargas nasales  
Portadores: localización en tonsillas y fosas nasales
- Todas las edades** son susceptibles:
  - más frecuente entre los cerdos de 8-16 semanas (2-6 m y adultos). Mortalidad del 20-80% (brotes agudos)

---



---



---



---



---



---



---

## SUPERVIVENCIA

- Muy lábil
  - Sobrevive 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
  - 4-6 meses en tonsillas

---



---



---



---



---



---



---

## Desinfectantes

- Altamente sensible a formaldehido, glutaraldehido, etanol, isopropileno y clorhexidina, en ausencia de materia orgánica
- Un estudio in vitro frente a 23 agentes mediante la prueba de la suspensión y el portador (Gutierrez *et al.*, 1995) y frente a 6 formulaciones comerciales basadas en compuestos de amonio cuaternario. Los mejores resultados fueron la cloramina T, el glutaraldehido y el merucrocromo con reducciones superiores a 6 logaritmos (máximo nivel de detección). En condiciones de campo, incluso presencia de materia orgánica, la mejor fue una mezcla con 10% de QAC, 2,5% de glutaraldehido, 6,8% de gliosal y 6% de formaldehido.

## S ó R a los antibióticos

Table 1  
MICs for 11 antimicrobial agents of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* clinical strains isolated during 1997-2004

Antimicrobial	No. of isolates with MIC of (ug/ml)	MICs <sup>a</sup>												MIC <sub>Ge</sub>	% Resistance				
		0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>512				
PEN	<3	5	27	129	30	2	3	8*	22							1	64	—	
AMOX	<	28	154	10	3	1	3>	30								0.5	64	—	
CEP	<184	16	15	8	1	1	1>	1>								0.5	2	0.4	
TET	<1	9	23	6	2	19	43	33	67	1>						32	24	73.8	
STR	<1															32	256	—	
GEN	<															8	8	9.2	
ERY	<	1														4	>4	—	
TMP	<206	1														4	>4	—	
NAL	<1	180	39	1	1>	10										≤1	≤1	—	
FIS																2	4	—	
FFN <sup>b</sup>	<85	90	32	22												35	64	>512	16.6
																0.25	0	0	

<sup>a</sup> Lines indicate breakpoint for resistance when available. <1: minimum value of concentration used; 1>: maximum value of concentration used. Abbreviations: PEN, penicillin; AMOX, amoxicilin; CEP, ceftiofur; TET, tetracycline; STR, streptomycin; GEN, gentamicin; ERY, erythromycin; TMP, trimethoprim; NAL, nalidixic acid; FIS, fusfomicina; FFN, florfenicol.

<sup>b</sup> Un estudio realizado sobre 229 cepas entre 1997 y 2004 (Gutierrez *et al.*, 2008) (principalmente serot 2 y 4, +81%). Otros estudios anteriores (1993 y 1995) entre 1987-88, con 57 cepas y 42 antimicrobianos y 61 cepas frente a 20 agentes antimicrobianos (Gutierrez *et al.*, 1993; 1995). R a la tetracolina >73% de las cepas (26.3% en 1993). R incrementadas en el caso de gentamicina. Diferencias entre serot 2 y 4 (estos más R a gentamicina, estreptomicina y eritromicina). Genes tet(B), tet(H), tet(L) y tet(O), asociados a plasmidos en 46 de los aislados R (Blanco *et al.*, 2006).

## Perfiles R de 229 cepas de APP entre 1997 y 2004

Nº aislados	Nº antimicrobianos	R a
129	1	TET
5	1	GEN
4	1	FIS
6	2	TET-GEN
23	2	TET-FIS
2	2	GEN-FIS
5	3	TET-GEN-FIS
1	4	TET-GEN-CEP-FIS

## TRANSMISIÓN

- Portadores sanos o portadores crónicos, la principal fuente de infección entre granjas
- Contacto directo (horizontal, nariz con nariz) es la vía principal
- Contacto indirecto por exudados contaminados transportados por empleados, utilaje, vehículos,....
- Transmisión aérea por aerosoles (1 m de distancia entre enfermo y sano) en naves
  - Entre locales es necesario el paso del 70% del aire de un local con enfermos a otro sano. En condiciones normales solo pasa el 2% por lo que el riesgo es muy bajo
- Riesgo alto en la enfermedad aguda, con alta humedad (supervivencia), tiempo fresco (supervivencia), dirección adecuada del viento y susceptibles en el área de riesgo
- Dentro de la granja:
  - Animales más viejos infectan nuevos que entran (sistema de rotación).
  - Hembras de reposición mantienen la infección
- Entre granjas depende de entrada de portadores y en menor medida aerosoles y otros indirectos

## Factores de Riesgo

- **Situaciones de estrés:** Habitualmente la infección subclínica + estrés = enfermedad clínica:
  - Cambios bruscos en el tiempo climático
  - Transporte
  - Mezcla de animales de distintas edades
  - Condiciones alejadas del bienestar animal
- **El papel de las madres:**
  - **Madres infectan lechones** en 2-11 semanas de vida (pueden infectarse en presencia de Ac calostrales). A los 11 días pueden ser positivos (PCR tonsilas) aunque lo habitual es en animales de 9 semanas y el máximo las 17
  - La inmunidad materna es clave en la epidemiología de la enfermedad. La caída de la inmunidad calostral coincide con el mayor % de infecciones (colonización en tonsilas)
  - La inmunidad calostral oscila entre 2 y 8 semanas, dependiendo del nivel de Ac obtenidos (Vigre *et al.*, 2003)

- **Distribución mundial de serotipos**
  - **Predominio** de uno o unos pocos en cada país o región.
  - **El comercio internacional** de animales jóvenes y portadores crónicos, el principal responsable de la **difusión Serotipos K (O)**

- **Difusión mundial de serotipos:**
  - América del Norte: 1, 2, 3, 5, 7
  - América del Sur: 1, 5 y 7
  - Europa: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9
  - Asia: 2 y 5
  - Australia: 1
  - **España:** 2, 4 y 7
    - Descritos los serotipos 1-13
    - Cepas del biotipo II de serotipos 4 y 12

## Pleuroneumonía Porcina en España

- No existen datos oficiales. No es enfermedad de declaración obligatoria
- Bien conocida por los clínicos
- Sola o con otros procesos neumónicos bacterianos o víricos (micoplasmas, estreptococos, glässer, pasteurelas, complejo respiratorio, PRRS, Aujeszky, influenza..)
- Interés económico extraordinario: mortalidad, disminución de producciones, alargamiento periodo de cebo, sacrificios, vaciado sanitario, pérdida de capital genético.
- Programas de control en explotaciones

Distribución de serotipos sobre un total de 859 aislamientos caracterizados en España en los últimos años

### SITUACIÓN DE LA PLEURONEUMONÍA PORCINA EN ESPAÑA

#### I. Estudios sobre la presencia de *A. pleuropneumoniae*

NT: no tipables; -: hasta junio de 2001. Entre 2002 y 2006 se contabilizaron, además, 614 aislamientos de *A. app*, que por el momento no han sido caracterizados en serotipos

Serotipo	Grupo 1 (144 cepas aisladas entre 1989 y 1995)	Grupo 2 (336 cepas aisladas entre 1992 y 1995)	Grupo 3 (318 cepas aisladas entre 1997 y 2001 <sup>1)</sup> )	Grupo 4 (61 cepas caracterizadas entre 2005 y 06)	Total de cepas caracterizadas	% relativo sobre el total de 859 cepas aisladas
1	8	25	11	-	44	5,1
2	20	25	210	43	298	34,6
3	8	14	1	2	25	2,9
4	60	86	49	5	200	23,2
5	0	2	2	5	9	1,0
6	8	11	11	14	44	5,1
7	17	77	8	6	108	12,5
8	2	3	3	-	8	0,9
9	7	15	-	-	22	2,5
10	7	5	-	-	12	1,3
11	0	22	1	5	28	3,2
12	1	1	1	-	3	0,3
NT	6	50	21	-	77	8,9
Total	144	336	318	61	859	100

Distribución de 859 aislamientos caracterizados, por CC.AA.

Serotipo	Andalucía	Aragón	CyL	C-LM	Cataluña	Extremadura	Galicia	Madrid	Murcia	Navarra	La Rioja	Valencia	Desconocido	Total
1	1	15		26					1	1	1	44		44
2	1	5	222		16			3	1		7	43	298	
3		3	7		11	1					1	2	25	
4		7	76	92		3		1	6		10	5	200	
5			3		1							5	9	
6		1	14		13			2				14	44	
7		2	9		80			3			7	1	103	
8			4		4								8	
9		1	5	1	12	1			1	1			22	
10				7	4		1	1					12	
11		1	3		15		1	1	1			2	5	28
12					1	2							3	
NT	1	1	24	3	38		2	2	2			1	5	77
total	1	22	390	4	314	2	7	7	9	9	1	29	80	859

Los 614 aislamientos no tipificados proceden en su totalidad de CyL, así como una parte indeterminada de los que figuran como origen desconocido



### Infecciones mixtas (con participación de 2 o más serotipos)

Serotipos	Núm de casos
2,4,1, NT	1
2,4,6,NT	1
2,6,7,8	1
1,2,4	1
1,2,7	1
2,4,7	1
1,2,NT	1
2,4,NT	4
2,6,NT	2
2,7,NT	1
2,4	11
1,4	1
2,7	1
2,8	1
4,7	1
2,NT	4
4,NT	1

### Persistencia de infección en las explotaciones

Periodo	Núm De explotaciones
97-98-99-00-01	1
98-99-00-01	3
97-99-00-01	1
99-00-01	8
98-99-00	2
97-98-00	2
97-98-00	1
00-01	19
99-00	4
99-01	2
98-00	1
97-01	1
97-00	2
97-99	2
97-98	1
01	15
00	39
99	11
98	1
97	6
total	122

## 2. Estudios serológicos

- 1824 sueros entre 1987 y 1988 recogidos de 9 provincias de CyL
- FC (Ag de células enteras) y ELISA (Ag hervido) de los serotipos 2, 3, 4, 7 y 8
  - FC: 40,4% de sueros positivos y 8,1% con actividad anticomplementaria. Los valores más altos en Ávila (53,8%) y los más bajos en Palencia (8,8%)
    - Los positivos se concentran en los meses más fríos (diciembre a marzo/abril)
  - ELISA: 60,3% de sueros positivos. Sensibilidad del 93,9%

## DIAGNÓSTICO CLÍNICO

- **F. Sobreaguda**
  - En explotaciones por 1<sup>a</sup> vez
  - Apatía, ↓ apetito, fiebre, ocasionalmente: vómitos, diarrea, tos, epistasis, movimientos masticatorios. En pocas horas postación, aceleración del pulso, cianosis. Al final disnea intensa y respiración bucal. Muerte en 24 horas
- **F. Aguda**
  - En explotaciones indemnes, síntomas respiratorios, anorexia, letargo y fiebre
- **F. Crónica**
  - En áreas endémicas o por pase desde forma aguda
  - Síntomas respiratorios inespecíficos, fiebre leve, complicaciones por otros agentes

## Lesiones Anatomopatológicas

- En general, **neumonía fibrinoso- hemorrágica necrosante**, con **pleuritis serofibrinosa**. Bilateral, especialmente **lóbulos diafragmáticos** (en ocasiones cardíaco y apical) y en la **región craneo-dorsal**
- **Formas sobreagudas**
  - Áreas de color negruzco, con mayor consistencia y septos distendidos (edema)
  - Adherencias pleurales. Líquido serohemorrágico y fibrina
- **Formas agudas**
  - Áreas neumónicas de color rojo negruzco, con nódulos necróticos dispersos
  - Pleuritis fibrinosa
- **Formas crónicas**
  - Engrosamiento fibroso de la pleura
  - Áreas necróticas encapsuladas de color blanquecino
  - Secuestros
  - Pleuritis fibrinosa, adherencias con la pared costal y corazón

## Diagnóstico diferencial

- **Enfermedades Bacterianas**
  - Enfermedad de Aujeszky
  - PRRS
  - Influenza porcina
- **Enfermedades Víricas**
  - Infección por Salmonella e. Choleraesuis
  - Infección por P. multocida
  - Enf. de Glässer
  - Infección por Actinobacillus suis
  - Infección por Streptococcus suis
- **Intoxicación por sal**

## DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

- 1. **Bacteriología. Aislamiento, identificación y tipificación antigenica**
- 2. **Detección directa de antígenos**
- 3. **Serología**
- 4. **Diagnóstico molecular**

---



---



---



---



---



---

### DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

- Aislamiento, identificación y tipificación del agente
  - Elección de material clínico: hisopos de tonsillas, secreción nasal, saliva, calostro, material lesiones
  - Transporte
  - Siembra en ágar chocolate (con/sin inhibidores) y ágar sangre con estría de *S. aureus*.
    - colonias de 1-2 mm, redondas, opacas, blanco-grisáceas (24-48 horas)
  - Agar PPLO + extracto fresco de levadura (10%), suero de caballo (5%), glucosa (0'1%) y NAD (0'025%):
    - colonias similares e iridiscentes (6 horas)
- Viabilidad escasa (3 - 4 días), con independencia de la T<sup>ª</sup> de conservación y del medio de cultivo seleccionado.
- Identificación bioquímica y tipificación con antisueros y/o molecular

#### 1. BACTERIOLOGÍA

---



---



---



---



---



---

### Evitando contaminantes indeseables. Recursos

- Técnicas de **dilución de la muestra** (Pijoan et al., 1983) incrementa la tasa de aislados
- Uso de **hisopos humedecidos en BHI** suplementado con NAD (0,01%) (Utrera et al., 2008)
- **Medios selectivos:** agar TSA o PPLO (20 µg/ml), sangre entera (50 µg/ml), 0,1% de NAD, cristal violeta, 16 µg/ml d µg/mle espectinomicina y 60 µg/ml de bacitracina (Wilson et al., 1987)

---



---



---



---



---



---

## CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DESTACABLES

- **Potentes actividades ureasa,  $\beta$ -galactosidasa y fosfatasa alcalina.**
- **Fermentación de manitol y xilosa.**
- **Hemólisis en agar sangre.**
- **Fenómeno CAMP + *S. aureus*.**

## Serotipos y serotipificación. Caracteres generales

- **15 (1-15) serotipos capsulares (Ag K)**
  - Ser 1, 3 y 5: cápsula gruesa y definida; Ser 2 y 7: capa tenue y discontinua
  - Tres tipos de enlaces entre los azúcares del polisacárido:
    - glucosídicos (ser 5 y 10)
    - fosfodiéster (2,3,6,7,8,9,11)
    - tipo fosfato (1,4,12): los más hidrolizables → polímero inestable
- **Ag O, inmunodominante, compartido por algunos:**
  - reacciones cruzadas con las cadenas laterales O del LPS: (serotipos 1, 9 y 11; serotipos 4 y 7; serotipos 3, 6 y 8). Las reacciones cruzadas también dependen de la manipulación del antígeno. **Fórmula antigénica K:O**
- **Otras causas de reacciones cruzadas: OMPs**
- **Antisueros policlonales en conejo o cerdo.**
- **Anticuerpos monoclonales**

## TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA (en general sobre el Ag capsular)

- **Fijación del Cto:**
  - Ag sonicado. Especie-específica, poco sensible. Compleja y laboriosa. Problemas
- **ELISA:**
  - Muchos Ag (PC, LPS, OMP..) con serot 5, pero reacciones cruzadas en el serot 1. Otros problemas
- **Aglutinación (problemas R) y coaglutinación (6 con 4 y 12; 4 con 7).**
  - Ventajas: rápidas y simples.
- **IFI:**
  - Reacciones cruzadas del 6 con todos y 4 con 7 & 5. No serot 1. Baja sensibil. y especificidad. Rápida y fácil
- **Inmunodifusión en gel:**
  - Lenta, difícil interpretar
- **Hemaglutinación indirecta:**
  - La mejor, permite cuantificar. Resuelve problemas de r. cruzadas (diferencia de título)



### Proteínas de la Membrana Externa (OMP) para la tipificación antigenica

- En los serotipos 1 a 8: **17, 32 y 42 kDa**
- En los serotipos 1 a 9: 7 perfiles sobre 3 grupos: **39-44, 16-16'5 y 29 kDa**
- **TbpA y TbpB.** Receptores de transferrina
- Proteína de **42 kDa**, en presencia de maltosa
- Lipoproteína **OmlA**, de **40 kDa**
- Proteína de **48 kDa**, común ser biotipo I

### Detección directa (a partir de tejidos) de Ag específicos de serotipo

- A partir de extracto pulmonar (sobrenadante de suspensión salina) por coaglutinación
- Inmunofluorescencia indirecta
- Inmunohistoquímica
  - Peroxidasa-antiperoxidasa
  - Avidina-Biotina-Peroxidasa
  - Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa

### Métodos de tipificación y caracterización moleculares

- **En general, se consideran:**
  - **M. basados en el LPS:**
    - por SDS-PAGE; resultados heterogéneos
  - **M. basados en ác. grasos volátiles:**
    - por cromatografía gas-líquido. Nivel especie. Anaerobios y micobacterias
  - **M. basados en proteínas:**
    - SDS-PAGE, MLEE (*electroforesis de enzimas multilocus*) y MLST (*polimorfismos de enzimas multilocus*)
  - **M. basados en el estudio de ác. nucléicos (caracterización genotípica)**

## Caracterización genotípica de las cepas

- **Hibridación de ácidos nucleicos:** Obtención del ADN, digestión y separación en gel de agarosa, transferencia a una membrana y detección de los fragmentos de interés por hibridación con una sonda marcada
  - Las sondas se dirigen frente a genes estructurales, de virulencia o los del ARNr 16S o 23S (ribotipado)
- **Caracterización basada en la PCR**
  - 1) desnaturalización; 2) hibridación de los *primers*; 3) extensión
  - *Primers*
    - **aleatorios (inespecíficos)** (AP –*arbitrary primed*-PCR):
      - *Primers* cortos (9-15 pb) diseñados al azar. Ej. M3 y T3-T7. Inconveniente: falta de reproducibilidad (no se aplica al diagnóstico; solo a cepas aisladas)
    - **Semiespecíficos**
      - *rep-PCR*: secuencias repetidas, conservadas y dispersas que hibridan en pequeñas regiones del genoma:
        - » ERIC: 126 pb, aparecen repetidas en las zonas intergénicas
        - » REP: 38 pb con palíndromos en extremos y fuera de regiones codificantes
      - región que codifica para el ARNr 16S (**Ribotipia**): zona muy conservada en la que se intercalan otras > variables
    - con **especificidad** para especies o subtipos....

## Aplicaciones de la PCR a la tipificación de cepas basadas en *primers* específicos

- **PCR-RFLP (polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción):**
  - Amplificación por PCR (*primers específicos*, incluido ARNr 16S) del *locus* objeto de estudio, digestión con enzimas y análisis del *locus* en muchas cepas para establecer un polimorfismo
  - Escasa discriminación. Precisa conocer previamente qué regiones son suficientemente variables para permitir el tipado
- **AFLP (amplified fragment length polymorphism):** obtención de fragmentos de restricción con 2 endonucleasas seguido de la ligación de 'adaptadores' de doble hebra y amplificación de los fragmentos modificados en condiciones de alta estrictividad con *primers* específicos
  - Discrimina mejor que otros métodos. Una buena alternativa (identificación y tipado)
  - Más reproducible que la AP-PCR
  - Más rápida que la PFGE

- **PFGE (pulse field gel electrophoresis):** lisis bacteriana de los microorganismos incluidos en bloques de agarosa. Digestión por enzimas de restricción y separación de los fragmentos con corriente eléctrica de campo pulsante (cambios de la polaridad a intervalos predeterminados)
  - Comparación de las imágenes permite agrupar y clasificar para estudios de tipado, filogenia y evolución
  - Equipamiento costoso pero resultados (perfíles de restricción o pulsotipos) muy reproducibles. En general, **el mejor método para muchas especies**

## 2. Detección de antígenos

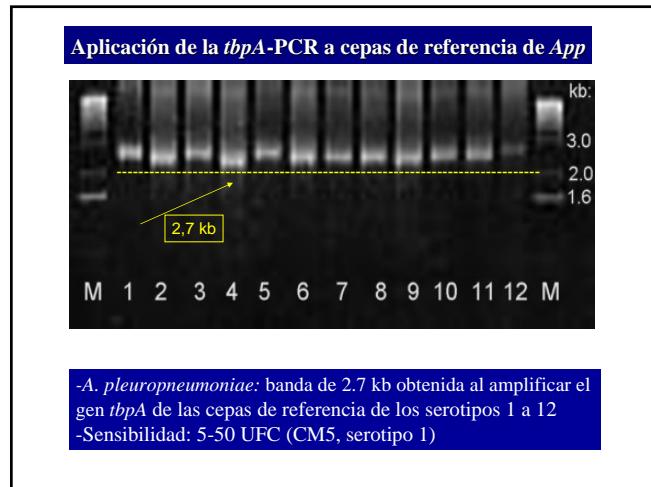
- Preparación de antisueros **policlonales** en conejo
- Coaglutinación:**
  - anticuerpos adsorbidos a la proteína A de *S. aureus*
- Aglutinación en látex:**
  - anticuerpos fijados a partículas de látex
- Inmunodifusión**
- Inmunofluorescencia indirecta**
- ELISA sandwich**
- Immunohistoquímica:**
  - peroxidasa-antiperoxidasa
  - avidina-biotina-peroxidasa
  - estreptavidina-biotina-peroxidasa

## 3. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO (detección de Ac)

- La infección por App produce Ac contra los principales Ag (K, OMP, LPS, Apx)
- Títulos altos anti-K o anti Apx I y II en cerdos con lesiones pulmonares. Si colonizan fosas nasales no Ac
- En general, inconvenientes debido a las reacciones cruzadas
  - Fijación del complemento:**
    - Inconveniente:
      - elevado poder anticomplementario del suero porcino (actividad procomplementaria): falsos negat
      - Leve actividad hemolítica frente a GR de certero
  - Aglutinación con 2-mercaptoetanol**
  - ELISA:**
    - diversas modalidades:
      - Indirecto
      - Inhibición
    - antígeno:
      - extractos celulares
      - O-LPS. Hay cepas con LPS incompleto o truncado que no se detectan
      - Toxinas. Un ELISA permite la detección de Ac frente a la Apx-IV. 100% específica y 93,9% sensible

## 4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR detección del ADN

- La PCR es una alternativa eficaz a los métodos anteriores:
  - detección de *A. pleuropneumoniae*
  - Tipificación (ya vista)
- Diversas posibilidades (lista no exhaustiva de genes diana):
  - gen *omIA*: detecta y clasifica (4 grupos)
  - gen para el polisacárido K (**cápsula**). En el serotipo 5
  - gen *aroA* PCR-RFLP: clasifica (3 grupos). Rc con *A. equuli*
  - genes de *Apx* -PCR
  - gen *tbpA* PCR:
    - diferencia de *H. parasuis*
    - PCR-RFLP: diferencia 10 tipos y separa de *A. suis* y *H. parasuis*.



**Perfiles RFLP de los productos PCR después de la digestión con diferentes enzimas de restricción**

Cepas	Serotipo	RFLP	Perfiles de restricción <i>tbpA</i>						Perfiles de restricción <i>tbpB</i>						
			Grupo	<i>Dra</i> I	<i>Nla</i> IV	<i>Apa</i> I	<i>Apa</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Rsd</i> II	<i>Nsi</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Apa</i> II	<i>Xba</i> I
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 27088	1	I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 27089	2	II	B	B	B	B	B	A	A	Nr	B	B	B	B	B
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 27090	3	III	A	C	A	B	A	A	A	A	B	B	B	B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> M62	4	IV	B	B	B	A	B	A	A	A	B	B	B	B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 33577	5	V	A	A	A	C	A	A	B	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
<i>A. pleuropneumoniae</i> Femp	6	VI	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	A	C	A
<i>A. pleuropneumoniae</i> WF83	7	VII	B	B	B	B	B	A	A	A	B	B	B	B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> 405	8	VIII	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	A	C	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> CVU13261	9	VII	B	B	B	B	B	A	A	A	B	B	B	B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> 13039	10	IX	B	C	B	B	B	A	A	A	B	B	C	B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> 56153	11	IV	B	B	B	A	B	A	A	A	B	B	B	B	B
<i>A. pleuropneumoniae</i> 8329	12	X	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>A. suis</i> CCM 5586	---	---	A	C	A	C	C	A	A	A	C	D	A	A	D

a), cuando la temperatura se disminuyó hasta los 5°C, apareció una débil banda de 1.8 kb.  
Nr, no realizado

4 y 11 están en el mismo grupo  
7 y 9 " " "

**Detección de App en pulmones y fosas nasales**

Cerdo	Serotipo inoculado	Tipo de muestra	Cultivo	Coaglutinación	Inmunodifusión	PCR-RFLP (nº de muestras positivas / número total de muestras)	
						<i>tbpA</i>	<i>tbpB</i>
1	1	Hisopo nasal	-	Nr	Nr	2 / 3	2 / 3
	ATCC 27088	Hisopo pulmón	+	Nr	Nr	2 / 2	2 / 2
	0	Pulmón (tejido)	nr	-	-	2 / 2	2 / 2
2	2	Hisopo nasal	-	Nr	Nr	1 / 3	1 / 3
	ATCC 27089	Hisopo pulmón	+	Nr	Nr	2 / 2	2 / 2
		Pulmón (tejido)	nr	-	-	2 / 2	2 / 2
3	4	Hisopo nasal	-	Nr	Nr	1 / 3	1 / 3
	M62	Hisopo pulmón	+	Nr	Nr	2 / 2	2 / 2
		Pulmón (tejido)	nr	-	-	2 / 2	2 / 2
4	PBS	Hisopo nasal	-	Nr	Nr	0 / 3	0 / 3
	Control	Hisopo pulmón	-	Nr	Nr	0 / 2	0 / 2
		Pulmón (tejido)	nr	-	-	0 / 2	0 / 2

Comparación de los resultados del aislamiento (cultivo) y PCR-RFLP a partir de animales infectados experimentalmente con <i>A. pleuropneumoniae</i>					
Cerdo n°	Serotipo inoculado	Tipo de muestra	Aislamiento	TbpA (n° positivos/total muestras)	TbpB (n° positivos/total muestras)
1	1	Hisopos nasales/pulmonares/Tejido pulmonar	-/+/nr	2/3; 2/2; 2/2	2/3; 2/2; 2/2
2	2	Id	-/+/nr	1/3; 2/2; 2/2	1/3; 2/2; 2/2
3	4	id	-/+/nr	1/3; 2/2; 2/2	1/3; 2/2; 2/2

Perfiles RFLP de los productos PCR de cepas clínicas de <i>App</i> , después de la digestión con diferentes enzimas de restricción										
Cepas clínicas	Serotipo	PCR	PCR	RFLP	Perfiles de restricción <i>tbpA</i>			Perfiles de restricción <i>tbpB</i>		
					<i>AvrI</i>	<i>TagI</i>	<i>AvnI</i>	<i>TagI</i>	<i>AvnI</i>	<i>XbaI</i>
<i>A. pleuropneumoniae</i> CMS	1	+	+	I	A	A	A	A	A	
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-118	1	+	+	I	A	A	A	A	A	
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-147	1	+	+	I	A	A	A	A	A	
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-99	2	+	+	II	B		B		B	B
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-140	2	+	+	II	B		B		B	B
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-152	3	+	+	III	A	A		B		
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-56	4	+	+	IV	B		A			
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-91	4	+	+	IV	B		A			
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-93	4	+	+	IV	B		A			
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-114	4	+	+	IV	B		A			
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-138	6	+	+	VI	A	A		C		A
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-148	6	+	+	VI	A	A		C		A
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-164	6	+	+	VI	A	A		C		A
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-74	7	+	+	VII	B		B		B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-117	7	+	+	VII	B		B		B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-134	7	+	+	VII	B		B		B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-144	7	+	+	VII	B		B		B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> NA-1	9 or 11 <sup>b</sup>	+	+	IV	B		A			

Cepas V-dependientes de clasificación dudosa. Utilidades PCR									
Cepas	Identificación bioquímica	Serotipo	Identificación mediante PCR				16SrRNA		
			<i>ApxIV</i>	<i>tbpB</i>	<i>tbpA</i>	Especies			
H 1	APP	NR	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 4	APP	NR	+	+	2.7	APP	APP		
H 9	d	NR	+	+	2.7	APP	APP		
H 12	HPS	APP 4	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 18	HPS	NR	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 19	d	NR	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 20	d	NR	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 24 A	d	NR	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 26	d	NR	+	+	2.7	APP	APP		
H 27	HPS	APP 4	-	-	-	-			Otras
H 32	APP	NR	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 33	APP	NR	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 34	APP	NR	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 41	APP	NR	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 42 A	d	APP 4	-	-	-	-			<i>A. minor</i>
H 96	d	NR	+	+	2.7	APP	APP		
H 98	APP	APP 5	-	-	-	-			Otras