

Actinobacillus pleuropneumoniae.
Epidemiología y Diagnóstico

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

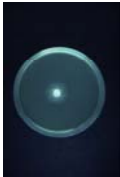
Pleuroneumonía porcina

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 CO₂) inicial. Medios convenientes. Estrategias
 - Caracteres** importantes →



Hemolisis, Manitol, Xilosa, Fosfatasa, Ureasa, β-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, φ alveolares y PMN**
- Bajas concentraciones interfieren con la función de **φ, PMN y cél 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 relacion 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-α, IL-1, IL-6, IL-8) → daño tisular y signos clínicos asociados
- Adherencia a células de la mucosa nasal, criptas de las tonsilas, 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 tonsilas
 - **proteína HlyX**
 - **proteasas**
 - **superóxido dismutasa**

PATOGÉNESIS

- Coloniza las tonsilas 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 ϕ alveolares. Cápsula protege. Concentraciones suficientes secretan toxinas y matan ϕ , células endoteliales, epiteliales y neutrófilos. Respuesta inflamatoria: **IL-1 β , IL-8 y TNF- α** .
- Lesiones comienzan 3-5 h postinfección (congestión y edema alveolar): formas agudas y sobreagudas. Se acumulan neutrófilos, fibrina, trombosis e infartos. Lesión evolucionaria 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, tonsilas y fosas nasales. Diferentes serotipos pueden colonizar, a la vez, las tonsilas 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 nasalesPortadores: localización en tonsilas 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 tonsilas

Desinfectantes

- Altamente sensible a formaldehído, glutaraldehído, 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 glutaraldehído y el mercurocromo 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 glutaraldehído, 6,8% de gliosal y 6% de formaldehído.

S ó R a los antibióticos

Antimicrobial	No. of isolates with MIC of (μg/ml)											MIC ₅₀	MIC ₉₀	% Resistance				
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>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	4			1	1					0.5	2	0.4	
TET		<1	9	23	6	2	19	48	53	67	1				32	64	73.8	
STR			<1						1	38	130	14	1	24		32	296	-
GEN						55	153									8	8	9.2
ERY	<	1				7	177		44						4	>4	-	
TMP					<216	1			1		1	10				≤1	≤1	-
NAL					<1	180	39	1	1		7					2	4	-
FIS										<39	308	39	5			64	>512	16.6
FFN*			<85	90	32	22										0.25	0.5	0

(*) Lines indicate breakpoint for resistance when available; (<) minimum value of concentration used; (>) maximum value of concentration used. Abbreviations: PEN, penicillin; AMOX, amoxicillin; CEP, cephalosin; TET, tetracycline; STR, streptomycin; GEN, gentamicin; ERY, erythromycin; TMP, trimethoprim; NAL, nalidixic acid; FIS, sulfisoxazole; FFN, florfenicol.

- Un estudio reciente sobre 229 aislados entre 1997 y 2004 (Gutierrez *et al.*, 2006) (principalmente serot 2 y 4, >81%). Otros estudios anteriores (1983 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 tetraciclina >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, estreptomycin y eritromicina). Genes tet(B), tet(H), tet(L) y tet(O), asociados a plásmidos 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, utillaje, 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 1as 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 a las 17
 - La inmunidad maternal es clave en la epidemiología de la enfermedad. La caída de la inmunidad calostrál coincide con el mayor % de infecciones (colonización en tonsilas)
 - La inmunidad calostrál 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 serotip 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 período 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 App, que por el momento no han sido caracterizados en serotipos

Serotipo	Grupo 1 (144 cepas aisladas entre 1989-1995)	Grupo 2 (336 cepas aisladas entre 1992 y 1995)	Grupo 3 (318 cepas aisladas entre 1997 y 2001*)	Grupo 4 (61 cepas caracterizadas entre 2005 y 06)	Total de cepas curatelerizadas	% 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

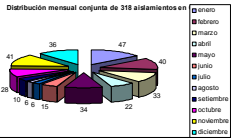
Distribución de 859 aislamientos caracterizados, por CC.AA.

Serotipo	Andalucía	Aragón	CyL	C-LM	Cataluña	Extremadura	Galicia	Madrid	Murcia	Navarra	La Rioja	Valencia	Desconocido	Total
1		1	15		26					1		1		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

Un estudio sobre 318 cepas caracterizadas, aisladas en CyL entre 1997 y 2001

mes	1997	1998	1999	2000	2001	total
Enero			6	12	27	45
Febrero	3		4	12	26	45
Marzo	3		2	19	8	32
Abril		1	2	11	8	22
Mayo		1	2	21	10	34
Junio	2	1	1	7	4	15
Julio				4		4
Agosto		1	2	4		7
Septiembre			2	8		10
Octubre	4	2	4	17		27
Noviembre	4	1	19	18		42
Diciembre	2	3	15	15		35
total	18	10	59	148	83	318



mes	ser1	ser2	ser3	ser4	ser5	ser6	ser7	ser8	ser11	ser12	NT	total
Enero	4	32		5		2					2	45
Febrero	2	32		4			1	1			5	45
Marzo		21		5		2	1			1	2	32
Abril		14		2		1	1	1			3	22
Mayo		26		2		3	1				2	34
Junio		10		5								15
Julio		3									1	4
Agosto		6		1								7
Septiembre		5		1	1		1				2	10
Octubre		15	1	7		1			1		2	27
Noviembre	2	27		8		1	1	1			2	42
Diciembre	3	19		9	1	1	2					35
total	11	210	1	49	2	11	8	3	1	1	21	318

Distribución mensual de serotipos de 318 cepas de App en CyL entre 1997 y 2001

Infección de explotaciones por 1 único serotipo

	1997 nº explotac	1998 nº explotac	1999 nº explotac	2000 nº explotac	2001 nº explotac	Nº total explotac infectadas
Infec por ser2	3	2	8	40	28	59
Infec por ser4	7	1	6	1	1	16
Infec por ser6				4		4
Infec por ser1				1		1
Infec por ser3			1			1
Infec por ser5			1			1
Infec por ser11			1			1
Infec por ser12				1		1
Infec por NT				3	1	4

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
97-99-00-01	1
98-99-00-01	3
97-99-00-01	1
99-00-01	8
98-99-00	2
97-99-00	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 1ª vez
 - Apatía, ↓ apetito, fiebre, ocasionalmente: vómitos, diarrea, tos, epistaxis, movimientos masticatorios. En pocas horas postración, 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 Viricas**
 - 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 antigénica
- 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 tonsilas, secreción nasal, saliva, calostro, material lesiones
 - Transporte
 - Siembra en ágar chocolate (con/sin inhibidores) y ágar sangre con estria 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 Tª 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 espectinomycin y 60 µg/ml de bacitracina (Wilson et al., 1987)

CARACTERÍSTICAS
METABÓLICAS DESTACABLES

- Potentes actividades ureasa, β-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 antigénica

- 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 ácidos 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 ácidos nucleicos (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:** 128 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 estringencia 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 (perfiles 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**
- **Inmunohistoquímica:**
 - peroxidasa-antiperoxidasa
 - avidina-biotina-peroxidasa
 - estreptavidina-biotina-peroxidasa

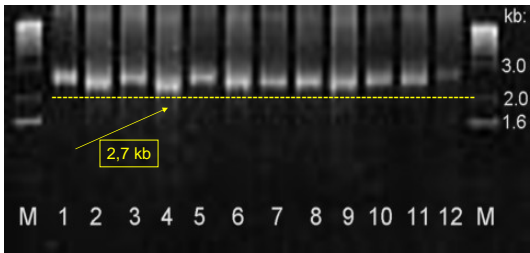
3. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO (detección de Ac)

- 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 carnero
 - **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*.

Aplicación de la *thpA*-PCR a cepas de referencia de *App*



-*A. pleuropneumoniae*: banda de 2.7 kb obtenida al amplificar el gen *thpA* de las cepas de referencia de los serotipos 1 a 12
-Sensibilidad: 5-50 UFC (CM5, serotipo 1)

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

Cepas	Serotipo	RFLP Grupo	Perfiles de restricción <i>thpA</i>									Perfiles de restricción <i>thpB</i>				
			<i>DnaI</i>	<i>NlaIV</i>	<i>AvaI</i>	<i>AclI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HhaI</i>	<i>BstEII</i>	<i>XbaI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>AvaII</i>	<i>XbaI</i>	<i>BglII</i>	<i>XbaI</i>
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 27088	1	I	A	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	B
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 27090	3	III	A	C	A	B	A	A	A	A	B	B	B	B	B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> M62	4	IV	B	B	B	A	B	A	A	A	B	B	B	B	B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> ATCC 33577	5	V	A	A	A	A	C	A	A	B	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
<i>A. pleuropneumoniae</i> Fcmφ	6	VI	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	A	C	A	A
<i>A. pleuropneumoniae</i> WFK3	7	VII	B	B	B	B	B	A	A	A	B	B	B	B	B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> 405	8	VIII	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	A	C	A	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> CVJ13261	9	VII	B	B	B	B	B	A	A	A	B	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	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> 56153	11	IV	B	B	B	A	B	A	A	A	B	B	B	B	B	C
<i>A. pleuropneumoniae</i> 8329	12	X	A	A	A	B	A	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

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 N°	Serotipo inoculado (cepa de referencia)	Tipo de muestra	Cultivo	Coaglutinación	Inmunodifusión	PCR-RFLP (n° de muestras positivas / número total de muestras)	
						<i>thpA</i>	<i>thpB</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 *A. pleuropneumoniae*

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 *App*, después de la digestión con diferentes enzimas de restricción

Cepas clínicas	Serotipo	PCR	PCR	RFLP	Perfiles de restricción <i>thpA</i>			Perfiles de restricción <i>thpB</i>		
	^a	<i>thpA</i>	<i>ThpB</i>	Grupo	<i>AvaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>AvaII</i>	<i>TaqI</i>	<i>AvaII</i>	<i>XbaI</i>
<i>A. pleuropneumoniae</i> CM5	1	+	+	I	A	A	A	A		
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-118	1	+	+	I	A	A	A	A		
<i>A. pleuropneumoniae</i> Sp-147	1	+	+	I	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 ^b	+	+	IV	B		A			

Cepas V-dependientes de clasificación dudosa. Utilidades PCR

Cepas	Identificación bioquímica	Serotipo	Identificación mediante PCR				16SrRNA
			<i>ApxIV</i>	<i>thpB</i>	<i>thpA</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 34 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

Correlación entre pruebas moleculares

Ausencia de correlación entre pruebas bioquímicas, inmunológicas y moleculares