

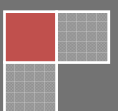
2009

**ESTUDIO
BACTERIOLOGICO Y
CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR POR
ERIC-PCR DEL *Haemophilus
parasuis* EN GRANJAS
PORCINAS INTENSIVAS
DE COLOMBIA.**

PAULA CONSTANZA MANRIQUE RAMIREZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS**

2010



**ESTUDIO BACTERIOLOGICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
POR ERIC-PCR DEL *Haemophilus parasuis* EN GRANJAS PORCINAS
INTENSIVAS DE COLOMBIA**



PAULA CONSTANZA MANRIQUE RAMÍREZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS
TESIS DE GRADO
BOGOTA, D.C.
2010**

**ESTUDIO BACTERIOLOGICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
POR ERIC-PCR DEL *Haemophilus parasuis* EN GRANJAS PORCINAS
INTENSIVAS DE COLOMBIA**

PAULA CONSTANZA MANRIQUE RAMÍREZ

**Tesis para optar al título de:
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIRECTORA
MARIA ANTONIA RINCON MONROY
MDV., MSc., cPh.D**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
BOGOTÁ, D. C., COLOMBIA.**

2010

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946.

**ESTUDIO BACTERIOLOGICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
POR ERIC-PCR DEL *Haemophilus parasuis* EN GRANJAS PORCINAS
INTENSIVAS DE COLOMBIA**

PAULA CONSTANZA MANRIQUE RAMÍREZ

APROBADO

MARIA ANTONIA RINCON MONROY

MDV.,MSc.,cPh.D.

Directora

FREDY O. GAMBOA JAIMES

MSc., Ph.D.

Jurado 1

GUSTAVO ARBÉLAEZ RENDÓN

MDV., MSc., Ph.D.

Jurado 2

JOSÉ DARÍO MOGOLLÓN

MDV., MSc., Ph.D.

Jurado 3.

**ESTUDIO BACTERIOLOGICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
POR ERIC-PCR DEL *Haemophilus parasuis* EN GRANJAS PORCINAS
INTENSIVAS DE COLOMBIA**

PAULA CONSTANZA MANRIQUE RAMÍREZ

INGRID SCHULER GARCIA

Ph.D.

Decana Académica

Facultad de Ciencias Básicas

MANUEL FRANCO CORTES

MD.Ph.D.

Director de Postgrado

Facultad de Ciencias Básicas

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS

BOGOTA, D. C., COLOMBIA.

2010

Hago un reconocimiento muy especial y dedico esta tesis a Dios y a todos los que de alguna forma estuvieron a mi lado con su apoyo, comprensión y amor.

Aquéllos que influyeron en mí y compartieron sus vidas conmigo forjando mi educación con valores y conocimientos. Nunca podré pagar tanta riqueza recibida a lo largo de mi vida y siempre estaré profundamente agradecida. Dedico esta investigación a mis Padres: Guillermo Manrique y Luz Mila Ramírez y a mi hermano, en quienes siempre encontré apoyo. Gracias por brindarme constantemente palabras de aliento y apoyo, para la culminación de esta investigación.

Con fe y esperanza se construye el futuro... con esperanza en conseguir lo que uno quiere, con fe ciega en uno mismo para lograrlo.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

- La Asociación Colombiana de Porcicultores (ACP), por su ayuda en la financiación y desarrollo de esta investigación.
- Al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA-CEISA), por la colaboración prestada a nivel humano y técnico.
- A mis padres por su amor incondicional, su aliento, su apoyo emocional y por permitirme ser una mejor persona día a día, con la formación que me han brindado.
- A la doctora María Antonia Rincón, por asumir la dirección de esta tesis, por sus acertados consejos en la realización y exposición de esta investigación y por haberme permitido realizar junto a su grupo de trabajo esta investigación. Sin su ayuda y experiencia, no hubiera sido posible llevar a feliz término este trabajo
- A la doctora Ivonne Hernández, por brindarme su amistad y compartir sus valiosos conocimientos y años de experiencia, los cuales fueron de vital importancia para el desarrollo y final término de esta investigación. Igualmente le quedare inmensamente agradecida por brindarme su constante apoyo, tenerme paciencia y ser siempre tan cordial y amable.

- A la doctora Ángela María Lora, quiero agradecerle por su colaboración y disposición de compartir conmigo sus apreciables conocimientos y experiencias, que fueron de gran ayuda en el desarrollo de esta investigación. Igualmente quiero agradecerle su constante apoyo, comprensión, orientación e infinita paciencia durante mi paso por el laboratorio de Medicina Porcina y Biología Molecular.
- A la Pontificia Universidad Javeriana, por haberme formado a nivel académico, investigativo y espiritual, todos estos años de estancia en su Alma Mater.
- A todo el personal profesional y técnico de los laboratorios del ICA-CEISA. Quisiera agradecerles por brindarme su apoyo y compartir junto a mí en estos dos años en el proceso de realización de mi tesis. En especial al laboratorio de Medicina Porcina, por su colaboración inestimable en el procesamiento de las muestras y por brindarme su amistad y apoyo.
- Quiero agradecerle a Dios, por brindarme paciencia, coraje, perseverancia e iluminarme día a día con su gracia infinita y conocimiento, para que esta investigación llegase a un buen termino.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. ANTECEDENTES	22
1.1. ETIOLOGIA de <i>Haemophilus parasuis</i>	22
1.1.1. Descripción del genero <i>Haemophilus spp.</i>	22
1.1.2. Características generales de la especie <i>Haemophilus parasuis</i>	23
1.1.3. Serotipificación	28
1.2. PATOGENESIS.	31
1.2.1. Mecanismos de patogénesis de <i>H. parasuis</i>	34
1.3. EPIDEMIOLOGIA	40
1.4. MANIFESTACIONES CLINICAS	43
1.4.1. Forma Aguda.	43
1.4.2. Forma Crónica	44
1.4.3. Lesiones Macroscópicas y Microscópicas.	45
1.5. DIAGNOSTICO	48
1.6. METODOS DE DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO.	50
1.6.1. Muestras clínicas adecuadas para el aislamiento	50
1.6.2. Aislamiento bacteriológico.	54
1.6.2.1. Técnica de la estría de estafilococos.	55
1.6.2.2. Caracterización bioquímica de <i>H. parasuis</i> .	57
1.6.3. Estudios de sensibilidad antimicrobiana.	65
1.7. MÉTODOS DE DIAGNOSTICO MOLECULAR.	70
1.7.1 Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, para <i>H. parasuis</i> (Hp-PCR).	70
1.7.2. Métodos de diagnostico genotípico para <i>H. parasuis</i>	77
1.7.2.1. Técnica de PCR para la amplificación de secuencias intergénicas del consenso repetitivo de las <i>Enterobacterias</i> (ERIC-PCR).	80

1.7.2.2.	Análisis de los patrones electroforéticos: ERIC-PCR.	87
1.8.	OTROS MÉTODOS DE DIAGNOSTICO	88
1.8.1.	Método de diagnostico serológico.	88
1.8.2.	Método de diagnostico inmunohistoquímico.	89
1.9.	DIAGNOSTICO CLÍNICO DIFERENCIAL	90
1.9.1.	Forma Aguda	90
1.9.2.	Forma Crónica.	92
1.10.	PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD	92
1.10.1.	Inmunidad y vacunas.	95
1.11.	PRUEBAS DIAGNOSTICAS.	97
1.11.1.	Validez de una prueba diagnóstica: Sensibilidad y Especificidad.	98
1.11.1.1.	Sensibilidad.	99
1.11.1.2.	Especificidad.	99
1.11.2.	Seguridad de una prueba diagnóstica: Valores predictivos.	100
1.11.2.1.	Valor predictivo positivo.	101
1.11.2.2.	Valor predictivo negativo.	101
1.11.3.	La influencia de la prevalencia.	102
1.11.4.	El Índice Kappa (K).	103
2.	MATERIALES Y METODOS.	105
2.1.	MARCO GEOGRAFICO.	105
2.2.	MUESTRAS EMPLEADAS.	105
2.3.	DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO.	119
2.3.1.	Pruebas Bioquímicas.	122
2.3.2.	Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.	123
2.4.	DIAGNOSTICO MOLECULAR.	126
2.4.1.	Procedimiento de preparación de las muestras, para la extracción de ADN de <i>H. parasuis</i>	126
2.4.2.	Extracción de ADN de <i>H. parasuis</i> , por el método de Proteínasa	127

	K y Fenol-cloroformo-isoamílico.	
2.4.3.	Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa para <i>H. parasuis</i> (PCR-Hps).	129
2.4.3.1.	Determinación de la sensibilidad de la técnica de PCR-Hps.	132
2.4.3.2.	Determinación de la especificidad de la técnica de PCR-Hps.	133
2.4.3.3.	Control de calidad de la PCR para el diagnóstico de <i>H. parasuis</i> .	135
2.4.4.	Técnica de PCR, para la ampliación de secuencia intergenicas del consenso repetitivo de las <i>Enterobacterias</i> (ERIC-PCR).	137
2.4.4.1.	Visualización de los patrones electroforéticos de ERIC-PCR.	140
2.5.	CONTROLES.	142
2.6.	ANÁLISIS DE DATOS.	142
3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.	144
3.1.	Recolección de muestras de laboratorio	144
3.2.	Análisis Bacteriológico	147
3.2.1.	Análisis de susceptibilidad antimicrobiano.	152
3.3.	Análisis Molecular	160
3.3.1.	Prueba de sensibilidad de la PCR para <i>H. parasuis</i> .	161
3.3.2.	Prueba de especificidad de la PCR para <i>H. parasuis</i> .	163
3.3.3.	Resultados de la prueba de PCR para <i>H. parasuis</i> .	165
3.4.	Análisis de datos.	171
3.4.1.	Evaluación de la concordancia entre las pruebas de cultivo bacteriológico y PCR con el Coeficiente Kappa.	171
3.5.	Prueba de ERIC-PCR	175
4.	CONCLUSIONES	185
5.	RECOMENDACIONES	188
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	191
7.	ANEXOS	210

INDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO	Pag.
Tabla 1.	Prevalencia de los serotipos reportados de <i>H. parasuis</i>	30
Tabla 2.	Características diferenciales de las distintas especies de <i>Haemophilus</i> .	56
Tabla 3.	Pruebas bioquímicas específicas para la identificación de <i>H. parasuis</i> .	61
Tabla 4.	Pruebas bioquímicas mínimas necesarias para la identificación de <i>H. parasuis</i> de otros microorganismos de la familia <i>Pasteurellaceae</i> NAD-dependientes, aislados a partir del tracto respiratorio en porcinos.	63
Tabla 5.	Selección de antimicrobianos primarios a evaluar en cepas de <i>H. parasuis</i> .	69
Tabla 6.	Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad.	98
Tabla 7.	Valoración del Índice Kappa.	104
Tabla 8.	Relación de muestras colectadas en la investigación, según procedencia, tipo de muestra examinado y técnica de diagnóstico empleado.	106
Tabla 9.	Relación de muestras colectadas en campo, según su procedencia y tipo de muestra.	110
Tabla 10.	Relación de muestras colectadas en campo, según el tipo de explotación empleado en granja y su procedencia geográfica.	111
Tabla 11.	Relación de muestras colectadas en campo, según la presentación de signos clínicos y su procedencia geográfica.	112

(Continuación): INDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO	Pag.
Tabla 12.	Relación de muestras colectadas en campo, según el tipo de medicación y vacunación empleado en granja y su procedencia geográfica.	113
Tabla 13.	Relación de muestras colectadas en laboratorio, según su procedencia y tipo de muestra.	115
Tabla 14.	Relación de los diferentes tipos de muestras empleados, según la técnica de diagnostica empleada en <i>H. parasuis</i> .	118
Tabla 15.	Parámetros de resistencia y sensibilidad de <i>H. parasuis</i> frente a los antibióticos empleados en este estudio.	125
Tabla 16.	Iniciadores empleados en la normalización de la técnica de PCR para <i>H. parasuis</i> .	130
Tabla 17.	Cultivos bacterianos empleados en la prueba de especificidad de la prueba de PCR, para el diagnostico de <i>H. parasuis</i> .	134
Tabla 18.	Iniciadores empleados en la normalización de la técnica de ERIC-PCR para <i>H. parasuis</i> .	137
Tabla 19.	Relación de productos de DNA de <i>H. parasuis</i> , analizados por la técnica de ERIC-PCR.	140
Tabla 20.	Proporción de muestras positivas de <i>H. parasuis</i> , por la técnica de cultivo bacteriológico.	148
Tabla 21.	Relación de muestras procesadas por aislamiento bacteriológico, para <i>H. parasuis</i> , según procedencia y tipo de muestra.	150
Tabla 22.	Relación de casos positivos por aislamiento bacteriológico, empleados en el análisis de susceptibilidad antimicrobiana,	153

según su procedencia geográfica y el tipo de muestreo.

(Continuación): INDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO	Pag.
Tabla 23.	Relación de resultados de sensibilidad y resistencia antimicrobiana en aislamientos de <i>H. parasuis</i> , frente a 20 antibióticos evaluados en el transcurso de la investigación.	156
Tabla 24.	Proporción de muestras positivas por la técnica de PCR para <i>H. parasuis</i> .	166
Tabla 25.	Resultados hallados en las muestras procesadas por la técnica de la PCR para <i>H. parasuis</i> , según la procedencia y el tipo de muestra.	168
Tabla 26.	Relación de resultados obtenidos por cultivo bacteriológico y PCR y la presencia ó ausencia de <i>H. parasuis</i> en una muestra.	172
Tabla 27.	Características operativas de la técnica de cultivo bacteriológico “versus” la técnica de PCR para <i>H. parasuis</i> , obtenidas en el programa epitale (Epi-info 6.0d).	172

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	Pag.
Figura 1.	Clasificación taxonómica del genero <i>Haemophilus sp.</i>	23
Figura 2.	Clasificación taxonómica (a) y filogénica (b), del gen 16rRNA de <i>H. parasuis</i> .	25
Figura 3	Imagen de microscopia electrónica de barrido de <i>H. parasuis</i>	27
Figura 4.	Imagen de un animal afectado por <i>H. parasuis</i> , el cual presentó los siguientes signos clínicos: poca motricidad, temblor, desorientación y piel con una coloración rojiza.	44
Figura 5.	Imagen macroscópica torácica de un cerdo, donde se observan lesiones producidas por <i>H. parasuis</i> , características a una poliserositis fibrinosa y bronconeumonía en lóbulo apical	46
Figura 6.	Imagen macroscópica abdominal de un cerdo, donde se observan lesiones producidas por <i>H. parasuis</i> , características por fibrina en cavidad abdominal.	46
Figura 7.	Imagen de una lesión macroscópica producida por <i>H. parasuis</i> .	47
Figura 8.	Representación esquemática de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	72
Figura 9.	Esquema de satelitismo para el aislamiento de <i>H. parasuis</i> .	119
Figura 10.	Imágenes de un crecimiento típico de <i>Haemophilus parasuis</i> frente a una estría de <i>S. aureus</i> .	121
Figura 11.	Esquema de diluciones seriadas, empleado en la prueba de sensibilidad a partir de DNA de <i>H. parasuis</i> .	133

(Continuación): INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	Pag.
Figura 12.	Fotografía de algunos resultados obtenidos en la prueba de PCR, donde se observan fragmentos de ADN de 821 pb de cultivos positivos de <i>H. parasuis</i> a partir de diferentes tipos de muestras.	136
Figura 13.	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana, aplicada a un cultivo de <i>Haemophilus parasuis</i> .	155
Figura 14.	Limite de sensibilidad de PCR empleando diluciones seriadas de DNA del control positivo de <i>H. parasuis</i> .	162
Figura 15.	Limite de especificidad de la PCR de <i>H. parasuis</i> .	164
Figura 16.	Dendograma de la diversidad genética por ERIC-PCR, de 12 muestras aisladas en porcinos infectados con <i>H. parasuis</i> .	178

LISTA DE ANEXOS

ANEXO	TITULO	Pag.
Anexo 1.	Protocolo empleado en la recolección de muestras en campo.	211
Anexo 2.	Preparación de soluciones y medios de cultivo, empleados en la investigación.	212
Anexo 3.	Flujograma para el aislamiento bacteriológico de <i>Haemophilus parasuis</i>	215
Anexo 4.	Tabla de diluciones empleada en la elaboración de la escala de Mac – Farland.	217
Anexo 5.	Estándar de turbidez de la escala de Mac – Farland, empleado en la preparación del inóculo.	218
Anexo 6.	Preparación de soluciones y reactivos empleados en la extracción de <i>H. parasuis</i> .	220
Anexo 7.	Flujograma para la extracción de ADN de <i>Haemophilus parasuis</i> .	222
Anexo 8.	Flujograma del protocolo de la técnica de PCR para el diagnóstico de <i>H. parasuis</i> .	225
Anexo 9.	Preparación de soluciones y reactivos empleados en el montaje de la electroforesis.	227
Anexo 10.	Flujograma del protocolo de montaje y elaboración de la electroforesis, para los productos de PCR de <i>H. parasuis</i> .	233
Anexo 11.	Flujograma del protocolo de la técnica de ERIC-PCR para el diagnóstico de <i>Haemophilus parasuis</i> .	235
Anexo 12.	Cálculos estadísticos de la prueba de Kappa.	237

RESUMEN

Haemophilus parasuis es un microorganismo emergente y considerado patogénico, por colonizar tempranamente porcinos luego de finalizar la inmunidad materna. Convirtiéndose en el principal impacto económico en la industria porcícola, por los altos costos en tratamientos con antibióticos y la alta mortalidad en animales, en la etapa aguda de la enfermedad. En Colombia no se han realizado estudios previos de este microorganismo, por esta razón el objetivo de esta investigación fue estudiar bacteriológicamente y caracterizar molecular por ERIC-PCR, aislamientos de *Haemophilus parasuis* en granjas porcinas intensivas de Colombia. Para ello, se colectaron 445 muestras de porcinos de las cuales se aislaron positivamente 33 (7,41%) por cultivo y 42 (9,4%) por PCR, en 77 granjas porcícolas. Los resultados sugieren que la concordancia entre las técnicas fue baja (Kappa de 0.3), sin embargo, se encontró un número relativamente elevado de muestras positivas por las dos técnicas, reflejando la importancia de las infecciones producidas por *H. parasuis* en los porcinos.

Igualmente, se genotipificó doce aislamientos de *H. parasuis* con ERIC-PCR, a partir del cual se observó que, las cepas evaluadas no compartieron un perfil genómico similar, con la excepción de un cluster (bootstrap 92%). Lo cual sugiere, que las granjas analizadas, se vieron afectadas por diferentes cepas de *H. parasuis* y por diferentes fuentes de infección. Esto es importante ya que se logró ampliar el conocimiento de la epidemiología molecular del agente y conocer la similitud entre cepas de diferentes piaras y según su distribución geográfica, para realizar posteriores estudios sobre epidemiología en granjas de todo el país.

Abstract: *Haemophilus parasuis* have emerged as a significant pathogen in the swine industry, as an early colonizer of piglets and it's considered one of the most common and costly problem in herds, because the high cost in the treatment with antibiotics and the high mortality in animals in the acute stage of the disease. In Colombia there have been no previous studies of this microorganism, therefore the objective of this thesis was to evaluate the presence of *Haemophilus parasuis* in intensive herds of Colombia with the method of culture, antimicrobial sensitivity and by molecular typing with ERIC-PCR. This study was conducted with 445 samples, of which 33 (7.41%) were positive by culture and 42 (9.4%) by PCR in 77 herds. Results suggest that correlation between booth techniques was low (Kappa 0.3), however, considering the relative high number of positive samples in both techniques, the importance of the infections caused by *H. parasuis* in swine, was reflected.

Furthermore, twelve isolates of *H. parasuis* were genotyped with ERIC-PCR, in which it was noted that the evaluated strains did not share a similar genomic profile, with the exception of one cluster (bootstrap 92%). This suggests that the herds analyzed were affected by different strains of *H. parasuis* and by different sources of infections. This is important because it succeeded in broadening the understanding of the molecular epidemiology of the agent and the similarity between strains from different herds, according to their geographical distribution, for further studies on epidemiology on herds throughout the country.

INTRODUCCIÓN

La producción de porcinos ha cambiado dramáticamente en los últimos años. Una nueva tendencia en la industria porcina, la cual incluye el destete temprano de los cerdos y un manejo específico de las piaras libres de patógenos (SPF), han contribuido a un incremento en la prevalencia y severidad de enfermedades bacterianas, como la causada por *Haemophilus parasuis* (Rapp-Gabrielson y col, 2006).

H. parasuis ha emergido como un patógeno de gran importancia para la industria porcícola, debido a que es un “agente colonizador temprano”, el cual bajo condiciones apropiadas (estrés, co-infecciones viral o bacteriana), ha contribuido de modo decisivo al incremento de la prevalencia y gravedad de la enfermedad. En granjas de alto estatus sanitario, la enfermedad aparece de forma fulminante, con muertes súbitas que, en ocasiones, adquieren niveles preocupantes y donde un brote puede ocasionar altos índices de morbilidad y mortalidad (Pijoan y col, 1997).

Se encuentra comúnmente en el tracto respiratorio superior de porcinos sanos y produce síntomas tales como: meningitis, artritis, endocarditis, poliserositis fibrinosa, poliartrosis, pleuritis, pericarditis, septicemia, neumonía y muerte súbita en lechones entre la segunda y sexta semanas de edad, después de ser destetados. Etapa en la cual, la inmunidad materna culmina y los cerdos pueden ser colonizados por diferentes microorganismos potencialmente patogénicos (Pijoan & Trigo, 1990; Rapp-Gabrielson y col, 1992). Además, este microorganismo puede llegar a actuar como un patógeno oportunista en casos de neumonía, luego de una infección con agentes virales (Síndrome reproductivo y respiratorio porcino, pseudorabia, virus de la influenza porcina, coronavirus respiratorio porcino) o agentes bacterianos (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*). Como consecuencia de estas

infecciones, el impacto económico en la industria porcícola está representado, por los altos costos en tratamientos con antibióticos y la alta mortalidad en animales, en la etapa aguda de la enfermedad. De hecho, el término “suis-ide disease” se emplea para describir el serio impacto de esta bacteria (MacInnes y Desrosiers, 1999).

El diagnóstico se realiza a partir de muestras de pulmón, cerebro, líquido cefalorraquídeo, líquido torácico, líquido abdominal y tonsilas, de donde es posible aislar cepas de diferente grado de virulencia, las cuales no se pueden diferenciar entre sí por los métodos tradicionales. Por otra parte, el control de la infección producida por *H. parasuis* es difícil y poco exitoso, especialmente cuando se utilizan vacunas comerciales que contienen serotipos diferentes a los circulantes en la granja.

En los últimos años, el uso de la biología molecular para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en la medicina veterinaria, han permitido el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como método de identificación rápida de microorganismos con alta sensibilidad y especificidad (Olivera y col, 2001; Olvera, 2007c). Permite detectar organismos muertos y organismos a partir de sitios muy contaminados, como los conductos nasales o muestras de tejidos de animales muertos por varias horas y que tienen una carga microbiológica alta. Desafortunadamente esta técnica de PCR solo detecta la presencia o ausencia del microorganismo, pero no permite prevenir una futura evaluación de las cepas, como lo hace una técnica de genotipificación o susceptibilidad antimicrobiana.

Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue estudiar bacteriológicamente y caracterizar molecularmente por ERIC-PCR, aislados de *Haemophilus parasuis* obtenidos de granjas porcinas intensivas de Colombia afectadas por la enfermedad.

1. ANTECEDENTES

1.1. ETIOLOGIA de *Haemophilus parasuis*.

1.1.1. Descripción del genero *Haemophilus sp.*

La familia *Pasteurellaceae* incluye desde patógenos importantes así como miembros de la flora comensal en humanos y muchas especies de animales. La familia está constituida por tres géneros: *Haemophilus*, *Pasteurella* y *Actinobacillus*, pero en el transcurso de los últimos años, nuevos géneros se han venido incluyendo dentro de la estructura de la familia *Pasteurellaceae* (Kielstein y col, 2001; Møller. y col, 1990).

El género *Haemophilus* pertenece a la *Pasteurellaceae*, en donde se incluyen 9 especies (*H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. ducreyi*, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*, *H. segnis*, *H. aegyptus*, *H. aphrophilus* y *H. paraphrophilus*) como se aprecia en el árbol taxonómico de la Figura 1. Dentro de las cuales las especies más frecuentes son *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*. Como género se caracteriza por agrupar bacilos Gram negativos pequeños, pleomórficos, que viven en las mucosas del hombre y animales (Trucco O, 2002).

Recientemente, el género *Haemophilus* fue delineado del resto de la familia por los requerimientos de algunos de sus miembros por uno u otro factor de crecimiento, como el factor X (hemina) y V (nicotinamida adenina dinucleótido ó fosfato de NAD). Sin embargo, con base en los datos de hidrólisis de ADN-ADN, una amplia cantidad de bacilos gram-negativos dependientes del factor V, procedentes de aves, están ahora incluidos dentro del género *Pasteurella* y el agente etiológico de la pleuroneumonía porcina se catalogó como *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* (Pohl y col, 1983, En: Møller y col, 1990). Adicionalmente a A.

pleuropneumoniae, los miembros de la familia *Pasteurellaceae* dependientes del factor V, incluyen a *Haemophilus parasuis* como el causante de la enfermedad de Glässer en porcinos, bajo el nombre provisional de taxón *Haemophilus* del “grupo minor” debido a su significado patogénico aun sin definir (Kilian col, 1978, En: Møller. y col, 1990).

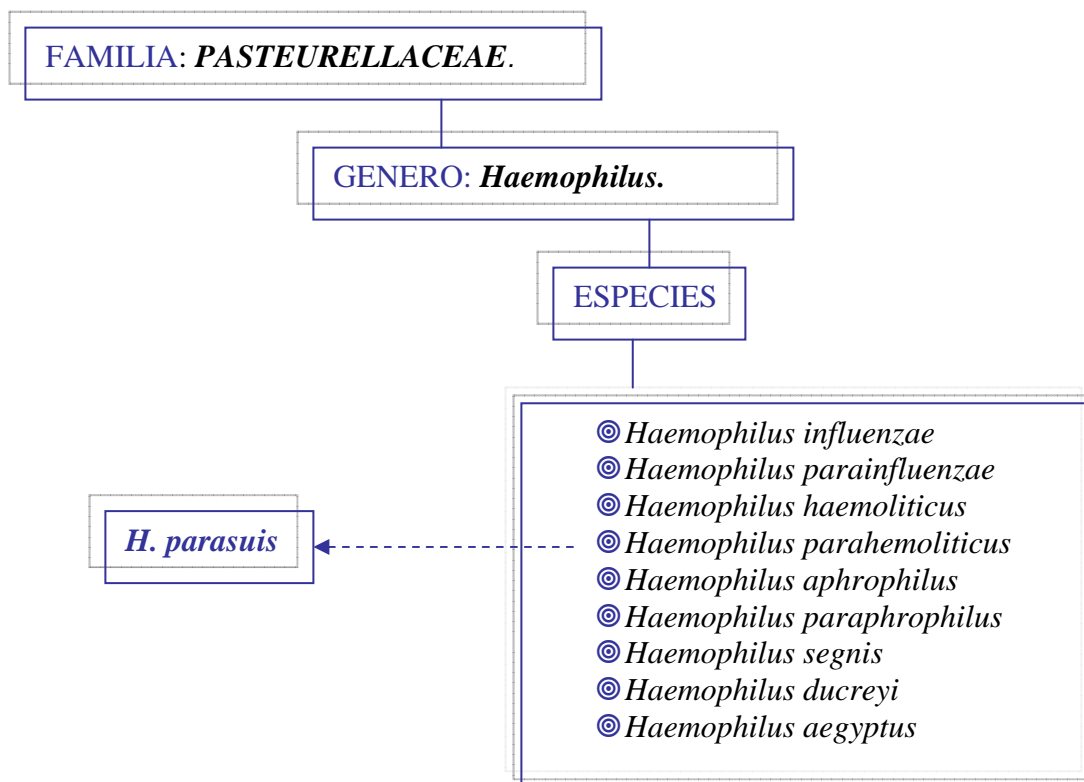


Figura 1. Clasificación taxonómica del género *Haemophilus* sp.

1.1.2. Características generales de la especie *Haemophilus parasuis*

K. Glässer (1910), fue el primero en reportar la asociación de un pequeño bacilo gram-negativo con una serositis fibrinosa y una poliartritis en porcinos (Rapp-Gabrielson y col, 2006), el agente causal de la enfermedad fue inicialmente identificado por primera vez por Schemer y Ehrlich en 1922 (Little, 1970, En:

Oliveira y col, 2004a). Sin embargo, no fue sino hasta 1943 cuando la bacteria fue caracterizada por Hjärre y Wramby, denominándosele como *Haemophilus suis* y posteriormente, Lecce en 1960 la redenominó como *Haemophilus influenzae suis* (Oliveira y col, 2004a).

Una caracterización bioquímica temprana de este agente etiológico de la enfermedad de Glässer, sugirió que presentaba una similitud con *Haemophilus suis* porque requería para crecer el factor X y el factor V (Lewis y Shope, 1931, En: Oliveira y col, 2004a). Sin embargo, Biberstein y White. (1969), demostraron que *H. parasuis* requiere únicamente para crecer del factor V pero no del factor X (Biberstein y White, 1969). Por lo tanto, se propuso a *H. parasuis* como nueva especie, teniendo como base el nombre ya aceptado convencionalmente, dentro de la especie *Haemophilus*, el cual usa el prefijo “para” para los organismos que no necesitan de los requerimientos de suplementación del factor X (hemina) (Oliveira. y col, 2004a; Olvera A, 2006b). Así de esta manera, finalmente se denominó a el *Haemophilus parasuis* en función de su independencia, para crecer, del factor X de coagulación de la sangre.

Actualmente, *H. parasuis* esta incluido dentro del género *Haemophilus*, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* de la clase de las γ -proteobacterias (Figura 2a). No obstante, la filogenia y taxonomía de la familia *Pasteurellaceae* es claramente problemático y la posición taxonómica de *H. parasuis* permanece incierta, debido a una clara falta de homología de los ácidos nucleicos, con otras especies del mismo género (Rapp-Gabrielson, 1999 y Olsen y col, 2005, En: Olvera A, 2006b).

Olvera A, (2006c) construyó con las secuencias del gen 16 rRNA de *H. parasuis* un árbol filogénico, donde se ilustra la dificultad para definir un taxón monofilético dentro de la familia *Pasteurellaceae* (Figura 2b). Las especies con un género diferente no generan un clúster monofilético, y muchas secuencias permanecen en ramas segregadas.

En cuanto a la hibridación de ADN-ADN, se encontró que *H. parasuis* es un grupo bacteriano genéticamente homogéneo, debido a que con la mayoría de las cepas produjo hibridación cruzada en un 85%; la cepa Nagasaki (serotipo 5) es una excepción porque mostró un bajo nivel de relación con otras cepas de *H. parasuis* (64%), (Morozumi y col, 1986).

Con los análisis de comparación de la secuenciación del gen 16S rRNA de todas las bacterias dependientes del factor V de crecimiento, se logro entender mejor la filogenia de los miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Estudios realizados por Møller y col, (1996), determinaron que *Actinobacillus indolicus* (Taxón F), era el familiar más cercano de *H. parasuis*, con niveles de similaridad que variaron entre 97,4 y 97,7%. Igualmente, Olvera A, (2006c), encontró que *Actinobacillus indolicus* al parecer bifurco muy reciente de *H. parasuis*, y actualmente ellos formaron una rama monofilética claramente separada, que se definió como clúster “parasuis” (Olsen y col, 2005, Olvera A, 2006c).

La diferencia entre estas dos especies es mínima y únicamente se pueden diferenciar por la producción de indol y producción de ácido a partir de rafinosa por parte de *A. indolicus* (Kielstein y col, 2001). Mientras que *Actinobacillus pleuropneumoniae* se diferencia por ser no hemolítico, ureasa negativo y catalasa positivo (Kielstein. y col, 2001).

Por otra parte, aunque fenotípicamente *Haemophilus parasuis* es homogéneo, existe una heterogeneidad intraespecífica muy clara y notoria, no solo desde el punto de vista inmunológico, sino también genético. Por este motivo se puede llegar a pensar, que en un futuro cercano, se produzca una reorganización taxonómica que conduzca a decisiones drásticas en lo que a la definición de la especie se refiere. En ella parece probable que los serotipos 4 y 5 se organicen como especies independientes (Rapp-Gabrielson, 1999; Morozumi. y col, 1986; Dewhirst. y col, 1992).

Microscópicamente, este agente etiológico se presenta como pequeños bacilos o coco-bacilos acusadamente pleomórficos, con ocasional presencia de cadenas filamentosas. Su longitud, por ello, resulta extremadamente variable, desde 1 a 7 μm de largo por 0,2 a 2 μm de ancho (Figura 3). Es un microorganismo Gram-negativo, no móvil. La presencia de una cápsula usualmente puede ser demostrada, pero su expresión es influenciada por cultivos in vitro (Rapp-Gabrielson y col, 1992). Sin embargo, la significancia de los reportes asociados a la ausencia de una cápsula con la virulencia, necesita ser más investigado (Rapp-Gabrielson, 1999). También la presencia o ausencia de una cápsula depende, del serotipo y de la cepa en estudio en cultivos de laboratorio. El factor NAD usualmente se suplementa a los medios de cultivo con Vitox o Isovitalex ó al sembrarse en Agar Sangre hemolizado al calor (Agar Chocolate) ó por crecimiento contiguo a una estría de *Staphylococcus aureus*, creando un satelitismo. Luego de 24-48 horas de crecimiento, las colonias se verán pequeñas, translúcidas y no hemolíticas en agar sangre (Rapp-Gabrielson, 1992).



Fuente: Rodríguez y col, (2000).

Figura 3. Imagen de microscopía electrónica de barrido de *Haemophilus parasuis*.

1.1.3. Serotipificación.

Tradicionalmente, la clasificación de *H. parasuis* se llevaba a cabo por serotipificación. La existencia de serotipos fue reportada por primera vez por Bakos y col (1952), cuyo primitivo esquema de clasificación reconocía los serotipos de la A a la D mediante una prueba de precipitación. En los años subsecuentes se fue ampliando el esquema de serotipificación por otros investigadores, obteniéndose así varias propuestas de serotipos nuevos (Schimmel y col. 1985., Morozumi y Nicolet, 1986b., Kielstein, 1991., Rapp-Gabrielson y Gabrielson, 1992; Rapp-Gabrielson, 1999). En cualquier caso, es destacable la heterogeneidad antigénica de este microorganismo, que origina no pocos problemas para su clasificación.

En 1992, Kielstein y Rapp-Gabrielson definieron 15 serovares basándose en antígenos somáticos estables al calor y empleando la técnica de inmunodifusión en gel (Olvera A, 2006a). Desafortunadamente, más del 41% de las cepas de campo fueron no-tipificables. Por este motivo actualmente, se conoce un total de 15 serotipos (1 al 15) (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992), basándose en la técnica de inmunodifusión en gel en la que se enfrentan a antisueros específicos producidos en conejo con un antígeno termoestable y resistente a enzimas proteolíticas, originalmente descrita por Morozumi y Nicolet, (1986b) y validada posteriormente por Rafiee y Blackall, (2000a). La técnica consiste en la detección de un antígeno tipo-específico, cuya composición es un polisacárido termoestable, resistente a la proteólisis enzimática, presumiblemente de origen capsular o composición lipopolisacárida ácida (LPS), aunque en algunas cepas no se excluye una composición diferente (Morozumi y Nicolet, 1986a). El uso de SDS-PAGE e Inmunoblotting con anticuerpos monoclonales ha puesto de manifiesto la heterogeneidad de los LPS (Rapp-Gabrielson, 1999).

Además de los intentos de clasificación en biotipos por la técnica de SDS-PAGE, ya comentados, se han propuesto algunas otras alternativas moleculares para la tipificación intraespecífica de *H. parasuis*, como es el caso de la técnica de electroforesis de multilocus enzimática (MEE) (Blackall y col, 1997). Ellos reportaron la diversidad entre 40 aislamientos de *H. parasuis* y 8 aislamientos de cepas de referencia empleando la técnica de MEE. Esta técnica permitió comprobar que las cepas del serotipo 5 tienen muy poca relación con otras especies, asemejándose únicamente a algunas cepas de los serotipos 4, 13 y a otras no tipificables. Sin embargo, esta técnica a pesar de que permite obtener buenos resultados de discriminación y agrupación con criterios epidemiológicos, resulta demasiado compleja para su utilización rutinaria en los laboratorios de diagnóstico.

Rapp-Gabrielson, (1999), reportó que en los últimos estudios de serotipificaciones a partir de aislamientos realizados en Japón, Alemania, Estados Unidos, Canadá y Australia, los que mayor prevalencia presentaron fueron los serotipos 5, 4 y 13, como se presenta en la Tabla 1. A partir de estos estudios se determinó que un alto porcentaje de los aislamientos fueron no tipificables, lo cual indicó que algunos aislamientos no lograron expresar suficiente cantidad de antígeno tipo-específico o que probablemente se trataba de la existencia de serotipos desconocidos, aun sin identificar. A estos inconvenientes se suman otros, como la presencia de reacciones cruzadas, la escasa inmunogenicidad de algunos serotipos, en particular el 7 y el 9, o la gran variabilidad que presentan las cepas incluidas en otros (Rapp-Gabrielson, 1999).

Tabla 1. Prevalencia de los serotipos reportados de *Haemophilus parasuis*.

Serotipos de <i>H. parasuis</i>	Frecuencia %			
	Japón ^a	Canadá y USA	Alemania	Australia
1	2.5	2.2	4.1	2.4
2	5.8	7.9	5.5	7.3
4	9.2	16.2	17.2	12.2
5	14.2	23.3	23.8	31.7
7 ó 10 ^b	-	4.8	4.5	9.8
12	-	7.0	2.8	2.4
13	-	11.0	4.5	17.1
14	-	9.2	1.7	0
3,6,8,9,11 ó 15	-	4.3	10.3	1.0
No Tipificables (NT)	68.3	14.1	26.2	12.2

Fuente: Morikoshi y col.1990; Rapp-Gabrielson y Gabrielson. 1992; Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992; Blackall y col. 1996, En: Rapp-Gabrielson, 1999.

^a Solo fueron probados para los serotipos de *H. parasuis* 1 y 5.

Las cepas se han discriminado dentro del género *H. parasuis*, por su reacción frente a antisueros policlonales obtenidos en conejo. Este es, sin duda, un procedimiento muy antiguo, iniciado ya en 1952 con un esquema muy simple que solamente reconocía cuatro serotipos (A, B, C y D) diferenciados por una reacción de precipitación frente a extractos celulares. En los años siguientes, en particular en las décadas de los años ochenta y noventa, se fueron incorporando descripciones de nuevos serotipos, inicialmente hasta 7 (serotipos 1 al 7), mediante un procedimiento de difusión en gel.

Las cepas asociadas con la enfermedad de Glässer correspondían a los serotipos 1, 5, 6 y 7, mientras que los serotipos 2 y 3 se asociaron a neumonía y el 3 (capsulado) se considero comensal. A esta lista se incorporaron paulatinamente otros serotipos, denominados "Tipos Jena 6 a 12", propuestos por Kielstein en Alemania.

Algunas cepas reaccionan tanto para los serotipos 7 como para el 10 y no pudieron ser diferenciadas por inmunodifusión (Rapp-Gabrielson, 1999 y Blackall y col. 1996). Las diferencias intraespecíficas de *Haemophilus parasuis*, no pueden ponerse de manifiesto desde el punto de vista metabólico y, desde hace ya años, los especialistas se esfuerzan por establecer relaciones inmunológicas moleculares, genéticas o fenotípicas, al menos en alguna medida para lograr diferenciarlo por tipificación, entre ciertos caracteres y la capacidad que tienen para producir daño en el hospedador.

1.2. PATÓGENESIS.

Møller y Kilian (1990), examinaron la diversidad y ecología de la familia *Pasteurellaceae* en el tracto respiratorio. El *Actinobacillus pleuropneumoniae* fue detectado por primera vez en muestras de amígdalas de dos porcinos enfermos severamente, mientras que *H. parasuis* fue aislado de la cavidad nasal y oral en porcinos sanos. En contraste, se logró aislar *A. minor*, *A. porcinus* y *A. indolicus* a partir de cavidades orales en la mayoría de los porcinos pero no de sus cavidades nasales (Oliveira y col, 2004a).

Amano y col (1994), aislaron exitosamente a *H. parasuis* a partir de cavidades nasales y tonsilas, luego de una inoculación intranasal a porcinos con los serotipos 1, 4 y 5. Posteriormente, Rapp-Gabrielson (1999), reportó que *H. parasuis* preferentemente coloniza en porcinos, la cavidad nasal y la tráquea pero no las tonsilas. Esto concuerda con la facilidad de aislar el microorganismo de la cavidad

nasal, pero no de tonsilas o pulmones de animales sacrificados (Moller y col. 1993. En: Rapp-Gabrielson, 1999). En contraste se ha reportado que el antígeno de *H. parasuis* es detectado en tejido de tonsilas pero no en cavidades nasales, tras la tinción con inmunoperoxidasa y la observación en microscopio electrónico (Amano y col, 1994. En: Rapp-Gabrielson, 1999).

Igualmente, Vahle y col (1997), reportaron al *Haemophilus parasuis* como colonizador temprano del tracto respiratorio superior en los porcinos, lo cual algunos consideran aun controversial. El organismo fue aislado consistentemente de cavidad nasal y tráquea; raramente se encontró en pulmones y no mucho en tonsilas. Por otro lado, Segales y col (1997), reportaron el aislamiento del organismo a partir de hisopados de tonsilas y tráquea, en porcinos inoculados intra-tráquealmente. Lo cuál corroboró en la revisión del tema MacInnes J y Desrosiers R, (1999), afirmando que *H. parasuis* es un residente común del tracto respiratorio superior.

Posteriormente, Oliveira y col, (2004a), sugirieron que *H. parasuis* coloniza preferentemente la mucosa nasal de los porcinos, pero el organismo también puede ser aislado del área de las tonsilas y de otras zonas del tracto respiratorio superior, como por ejemplo la tráquea. Kirkwood y col, (2001), igualmente reportaron resultados similares, sin embargo, lograron mejores aislamientos a partir de hisopados nasales que de hisopados traqueales.

El *H. parasuis* se transmite de forma directa por contacto, o indirectamente a través de la vía aerógena, aunque la capacidad de difusión puede alcanzar alguna distancia vehiculado por el aire. Se ha establecido que el proceso comenzaría con la presencia, como comensal, de *H. parasuis* en las fosas nasales. Ocasionalmente, desde allí, podría pasar al oído y producir otitis media, aunque por otro camino, la entrada supondría, de comienzo, un proceso derivado de faringitis y sinusitis, primer paso para la neumonía. Un segundo estadio de penetración, con el microorganismo en sangre (septicemia) supondría, o bien la muerte del animal, o bien la colonización de

serosas con producción de los cuadros típicos de meningitis y encefalitis, poliserositis (ambos casos, por lo general, terminan también en la muerte del animal), abortos y poliartritis.

Al contrario que *A. pleuropneumoniae*, este microorganismo coloniza preferentemente la cavidad nasal y la tráquea, pero no las tonsilas. Cualquier tipo de daño a nivel de la mucosa nasal, facilita extraordinariamente la invasión aunque se desconocen los factores que desencadenan el proceso. Es poco frecuente el hecho, que varias cepas o serotipos estén presentes en el mismo animal o en la misma explotación, como se ha demostrado en varias ocasiones (Rapp-Gabrielson, 1992, 1993). Dentro de *H. parasuis* se acumulan una enorme variedad de cepas entre las que, al menos desde el punto de vista práctico y en lo que a la patogenicidad se refiere, existen diferencias considerables. Algunas, se relacionan con procesos morbosos, en tanto que otras pasan por ser comensales del tracto respiratorio superior de las pjaras.

Varios grupos de investigadores reprodujeron la enfermedad experimentalmente, por la vía intraperitoneal, intravenosa, subdural y por vía intratraqueal (Little. 1970, En: Oliveira y col, 2004a).

Modelos experimentales han sido desarrollados para investigar la patogénesis de infección de *H. parasuis*. Vahle y col (1995), examinaron eventos secuéciales en una infección, tras inocular intra nasalmente a porcinos con una cepa de *H. parasuis*. Luego de 12 horas post inoculación, se logró recuperar el microorganismo de la cavidad nasal y traqueal; luego de 36 horas, se logró aislar de cultivos de sangre y a las 36 y 108 horas se aisló de tejido sistémico. La colonización se asoció con una rinitis purulenta, pérdida focal de cilios y una aguda hinchazón de las células dentro de la mucosa nasal y traqueal. (Vahle, 1996, En: Rapp-Gabrielson, 1999). Las células bacterianas no están cercanamente asociadas con los cilios o el epitelio y el mecanismo de colonización o destrucción celular no está determinado (Rapp-

Gabrielson, 1999).

El potencial patogénico de las cepas de *H. parasuis* en una piara, se considera también como un factor de severidad y progresión de una enfermedad de origen sistémico. Los serotipos comúnmente aislados de vías respiratorias superiores en porcinos, incluyen los serotipos poco frecuentemente aislados de sitios sistémicos (Bloch, 1985; Rapp-Gabrielson, 1993). Se cree que una subpoblación de cepas de *H. parasuis* en el tracto respiratorio superior, tienen la capacidad de invadir sistemáticamente y producir enfermedad (Rapp y col 1986, Rapp-Gabrielson, 1993).

Por otro lado, se ha demostrado en estudios *In Vitro* que *H. parasuis*, es capaz de producir una biopelícula (biofilm). La producción de biofilm comúnmente se relaciona con bacterias patogénicas y causantes de infecciones progresivas. Esta matriz de polisacárido contiene un consorcio bacteriano que facilita su adhesión a superficies sólidas y confiere resistencia a agentes antimicrobianos y fagocitosis de los macrófagos, siendo por este motivo un factor muy importante de patogénesis (Martínez y col. 2006).

Para el entendimiento de la patología causada por este microorganismo, es necesario beneficiarse de información colectada en proyectos de secuenciación genómica y en la identificación de factores de virulencia y tropismos del huésped, que pueden ser cruciales para explicar la susceptibilidad y diseminación de las enfermedades por venir (Homes, 1999. En: Olvera A, 2006b). Sin embargo, las expresiones recombinantes de genes específicos así como la producción de mutantes definidos, pueden llegar a establecer un papel importante en la virulencia de *H. parasuis*.

1.2.1. Mecanismos de patogénesis del *H. parasuis*.

A partir de datos clínicos se puede llegar a asumir que las cepas virulentas de *H. parasuis* tienen un mecanismo de invasión y adhesión, y recientemente varios estudios han intentado identificar los factores específicos de virulencia. Algunos

estudios que se basaron en la expresión de genes bajo condiciones que imitan un ambiente *in vivo*. Hill y col, (2003) y Melnikow y col, (2005), encontraron algunas diferencias en los genes expresados e identificados como [e.j. ácido acil-CoA sintetasa (fadD), diadenosina tetrafosfatasa (apaH), cisteína sintetasa (CysK), sistema PTS y la captación del glicerol-3-fosfato (GlpT)], los cuales necesitan estudios más extensos para determinar la principal función de estos genes en la virulencia de *H. parasuis*. Los genes involucrados en la captación del hierro también han sido identificados en dos regiones genómicas diferentes (en la captación del hidroxamato férrico y en las proteínas de unión de la transferrina) (Del Rio y col, 2005; Bigas y col, 2006 y Del Rio y col, 2006b).

De modo particular, desde 1995 se dispone de evidencias acerca de la existencia de proteínas receptoras de transferrina, que tan importantes papeles desempeñan en otros microorganismos próximos como *A. pleuropneumoniae*, *H. influenza* y *N. meningitidis* (entre otros). Recientemente, en el trabajo realizado por Rodríguez, y col (2000), se demostró la existencia de los genes *tbpA* y *tbpB* que codificaban para las proteínas correspondientes, receptoras de transferrina sérica porcina y otro tanto ocurre, también, respecto de los otros genes que forman parte del complejo TonB (*exbB* y *exbD*). Lo cual no excluye, de la existencia de otros mecanismos alternativos de captación de hierro, como los sideróforos.

Por otro lado, la enzima neuraminidasa es un factor importante de virulencia en los otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* y ha sido purificada y caracterizada (Lichtensteiger y Vimr, 1997; 2003), encontrándose que más de un 90% de los aislamientos de campo mostraron actividad de la neuraminidasa. Esta enzima en asociación con la permeasa y la aldolasa, pueden contribuir a la virulencia bacteriana, por el agotamiento de los hidratos de carbono de las células del huésped. Adicionalmente la neuraminidasa, además de cumplir un rol nutricional, sirve como mediadora en la remoción de residuos de ácido cítrico a partir de glicoconjugados que desenmascaran los receptores necesarios en la colonización o invasión de células

huésped, interfieren con el sistema de defensa del huésped con un decrecimiento en la viscosidad de la mucina y también se relaciona con la supervivencia intracelular y la adherencia celular (Corfield, 1990., Lichtensteiger y Vimr, 1997. En: Oliveira y col, 2004a). Sin embargo, el papel de esta enzima como factor de virulencia no es claro, ya que puede relacionarse como potencial de virulencia o como una limitación nutricional (Olvera A, 2006b).

Los procesos de encapsulación, las adhesinas, las fimbrias, liposacáridos (LPS), las proteínas de membrana externa (PME), proteasas y exotoxinas, se han asociado con la colonización del tracto respiratorio superior por varios miembros de la familia *Pasteurellaceae* (Biberstein, 1990; (Verdugo y col, 2003), incluyendo el género *Haemophilus* (Nicolet, 1990). La asociación entre la expresión de la cápsula, los perfiles proteicos en toda la célula y la virulencia de *H. parasuis* es muy controversial. Morozumi y Nicolet (1986a), reportaron que la mayoría de los aislamientos de *H. parasuis*, a partir del tracto respiratorio superior en porcino sanos, eran encapsulados, mientras que los aislamientos a partir de sitios sistémicos, eran predominantemente no encapsulados. (Nicolet, y col, 1980., Morozumi y Nicolet, 1986a). Sin embargo, si se realiza un pase *in vivo*, se pueden seleccionar los clones encapsulados de *H. parasuis* y manipularlos para que cuantitativamente dicha encapsulación se vea reducida luego de un pase *in vivo* (Rapp-Gabrielson y col, 1992). No obstante, a pesar de que la producción de dichas estructuras (capsula y fimbrias) se detecto luego de pases *in vivo*, no han logrado asociarse claramente como factores de virulencia (Munch y col, 1992. En: (Olvera A, 2006b).

Las proteínas de membrana externa (PME) son importantes en la regulación de proteínas de superficie, en respuesta a las condiciones de crecimiento en el medio ambiente y se ha determinado su participación como receptores para elementos indispensables para su crecimiento, además de que estas proteínas son capaces de inducir cierta respuesta inmune (Verdugo y col, 2003). En estudios en los que han comparado los perfiles proteicos de cepas con diferente factores de virulencia, se

identifico una proteína de 37KDa como posible marcador de virulencia, pero aun no se ha propuesto el papel que desempeña dicha proteína (Oliveira y col, 2004a; Rosner y col, 199. En: Olvera A, 2006b). Se ha asociado diferencias en la virulencia, con determinadas proteínas de superficie externa; los perfiles de las PME de un grupo de cepas relacionadas entre sí con procesos sistémicos, sugirió una cierta clonalidad de las mismas, dada la estrecha homogeneidad observada y una probable implicación como factor de virulencia o como marcador.

Zucker y col (1996), examinaron la producción de los lipooligosacaridos (LPS) y endotoxinas por *H. parasuis* y encontraron que las cepas virulentas y no virulentas, compartían patrones similares. Este microorganismo produce estructuras que parecen fibras luego de un pasaje *in vivo* (Munich y col, 1992), pero el aislamiento común de este agente, a partir de cavidades nasales en porcino aparentemente sanos, aumenta el interrogante del concepto clásico de que la adhesión en el sitio de entrada sea un prerequisite para la invasión inicial del microorganismo (Nicolet, 1990. En: Oliveira, 2004b).

Los LPS tienen una cadena O específica, es la que le confiere a las bacterias la característica fenotípica de, cepas lisas, semirugosas y rugosas. El antígeno O, es el responsable de las reacciones cruzadas entre los serotipos. Las propiedades biológicas del LPS son: tiene actividad de endotoxina, gelifica a los amebocitos del género *Limulus*, produce reacción de Schwartzman, actúa como un pirógeno, induce la liberación de mediadores pro inflamatorios y estos mediadores activan varias células, como macrófagos y neutrófilos y juega un papel importante en la inflamación aguda (Verdugo y col, 2003).

Con respecto a los LPS y las endotoxinas, por el momento sus patrones moleculares no se han asociado con la virulencia, aunque se sabe que tiene un papel importante en la patogénesis (Amano y col, 1997), igualmente, se han relacionado con la aparición de trombosis y coagulación intravascular diseminada, (Nicolet, 1990).

Los factores involucrados en la invasión de *H. parasuis* durante su infección son en su mayoría desconocidos. Vahle y col, (1997) demostraron que el aislamiento de *H. parasuis* de la porción media de la cavidad nasal estaba asociada con la rinitis supurativa aguda, así como a las pérdida de cilios e hinchazón de las células en la mucosa traqueal y nasal. Por esta razón, Oliveira y Pijoan (2004a), plantearon la hipótesis en la que se estimaba que dichas alteraciones en las mucosas del animal, permitan que el *H. parasuis* lograra una mejor invasión y ganara acceso por el flujo sanguíneo; dicha transmisión causada por este microorganismo, no ha podido ser demostrada, ni por microscopia electrónica ni por inmunohistoquímica en aquellas áreas en las que se presentó pérdida de los cilios y degeneramiento celular. Por este motivo ellos concluyeron y sugieren, que este daño celular en los cilios de las mucosas, se atribuya a alguna clase de toxina soluble, producida por *H. parasuis* (Oliveira y Pijoan, 2004a).

En lo que hace referencia a la presencia y participación de otras estructuras en la virulencia como ocurre con las fimbrias, que desaparecen cuando se cultivan en medios inertes sólidos, su posible papel en la adherencia de la bacteria a las células o superficies inertes, aún no ha sido establecido de forma concluyente.

Poco se conoce, por el momento, sobre la razón de la virulencia de algunos serotipos de *H. parasuis*, que justificaría la morbilidad y mortalidad en algunos casos de enfermedad. Los serotipos 1, 5, 10, 12, 13 y 14 se asocian, por lo general, con casos agudos, capaces de producir la muerte del animal en un período de cuatro días, mientras que los serotipos 2, 4 y 15 desencadenan la forma crónica de la enfermedad, con graves lesiones de poliserositis y artritis. El serotipo 8 se califica de virulencia ligera, mientras que los serotipos 3, 6, 7, 9 y 11 no se relacionan con signos clínicos (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992).

Rapp-Gabrielson y Gabrielson, (1992) y Amano y col (1994), estudiaron los serotipos que se usaban comúnmente como indicadores de virulencia. Realizaron una inoculación intraperitoneal con los serotipos 1, 5, 10, 12, 13 y 14, en porcino SPF (porcino libres de patógenos) causando la muerte o morbilidad en los animales, luego de cuatro días; por lo que estas cepas fueron clasificadas como altamente virulentas. El serotipo 2, 4 y 15 causaba poliserositis, pero no la muerte, por lo que se clasificaron como moderadamente virulentas. Los serotipos restantes (3, 6, 7, 8, 9 y 11) no producen signos clínicos así que fueron considerados como no-virulentos (Oliveira y col, 2004a).

Lo que parece claro es que el serotipo 5 es el más virulento y el que se considera como referente de patogenicidad en todos los estudios. En el extremo contrario, también parece que hay unanimidad respecto de la falta de virulencia de los serotipos 3, 6 y 7. Las grandes discusiones se producen respecto de los serotipos 2 y 4. La serotipificación de asilamientos de casos de campo mostró que los serotipos 2, 4, 5, 12, 13 y 14 se encontraban equitativamente tanto en los sitios sistémicos como respiratorios (Rapp-Gabrielson y Gabrielson, 1992; Blackall, y col, 1996). Un estudio de prevalencia en piaras de Norte América, mostró que las cepas más patógenas de origen sistémico, eran los serotipos 1, 2, 4, 5, 12, 13, 14, o NT; aquellas del tracto respiratorio superior de animales sanos, fueron homogéneas genéticamente (diferentes a las que fueron asiladas de sitios sistémicos) y predominantes del serotipo 3 ó NT (Oliveira y col, 2003; Oliveira y col, 2004a).

En el primer grupo, de serotipos 'virulentos', también se han establecido diferencias en relación con la infección experimental en cobayo, por vía intratraqueal, animal que se considera un buen modelo de laboratorio. Así, los serotipos 1 y 5 resultan los más invasivos, causando la muerte de los animales a dosis altas ($1,3 \times 10^{10}$ UFC, en el caso del serotipo 1 y de $4,2 \times 10^9$ UFC en el caso del serotipo 5), mientras que en dosis más bajas ($1,3 \times 10^8$ UFC en el caso del serotipo 1 o $4,2 \times 10^7$ UFC, en el caso

del serotipo 5) producían estados de septicemia persistente. En este estudio, los serotipos 2 y 6 resultaron menos virulentos, aunque en algunos casos fueron causa de bronconeumonía y muerte. Finalmente, los serotipos 3, 4 y 7, solo produjeron signos transitorios y lesiones mínimas (Rapp-Gabrielson y col, 1992).

1.3. EPIDEMIOLOGÍA.

Haemophilus parasuis es un microorganismos que únicamente causa infección en porcinos. Se aísla comúnmente a partir de secreciones nasales de animales sanos (Bertschinger y Nicod, 1970; Harris y col, 1969; Smart y col, 1989. En: Rapp-Gabrielson, 1995) por lo que se le considera parte de la flora normal del animal. También se le ha aislado de porcino con neumonía, pero no a partir de órganos sanos (Little 1970; Moller y col, 1993. En: Rapp-Gabrielson, 1995). En piaras convencionales, este organismo es el que tiene mayor prevalencia y el que se aísla más tempranamente en hisopados nasales de porcino de una semana de edad (Kott, 1983, En: Rapp-Gabrielson, 1995).

El *Haemophilus parasuis* produce una enfermedad denominada “*Enfermedad de Glässer*”, porque el primero en reportar aislamientos de este microorganismo en Alemania en 1910, fue K. Glässer (Hjärre y Wramby, 1943; En: Rapp-Gabrielson, 1999), a partir de porcinos que presentaban inflamaciones fibrinosas en las articulaciones (poliserositis fibrinosa y poliartritis) y meningitis en animales jóvenes, asociada a condiciones estresantes de manejo o traslados, con alta mortalidad (Amano y col, 1994). Inicialmente fue identificado como causa de la misma *Haemophilus suis*, al que durante muchos años se le implicó en el proceso conjuntamente con *Mycoplasma hyorhinis*. Desde 1962, se mantuvo el primero como causa única, aunque su denominación cambió después a *Haemophilus parasuis*. Una neumonía aguda causada por *H. parasuis*, sin la sintomatología característica de la poliserositis, también se ha reportado como síntoma indicativo de la enfermedad de Glässer (Little, 1970, En: Oliveira y col, 2004a).

H. parasuis usualmente produce septicemia aguda y su endotoxina induce coagulación diseminada intravascularmente, lo cual produce la formación de microtrombos en varios órganos (Peet y col, 1983; Amano y col, 1994; Oliveira y col, 2004a).

La introducción de *H. parasuis* puede resultar en enfermedades sistémicas de alta morbilidad y mortalidad, afectando a porcinos en cualquier etapa de producción. Actualmente, este microorganismo es uno de los problemas más serios, asociados con la mezcla de porcinos de diferentes piaras o la introducción de un nuevo lote de animales a una piara (Smart y col. 1989; Menard y Moore 1990. En: Rapp-Gabrielson, 1995).

El papel de *H. parasuis* en las enfermedades respiratorias es más complejo. Se ha demostrado que la rinitis purulenta que esta asociada a colonizaciones por *H. parasuis*, soporta el posible rol, como factor de predisposición de otros patógenos bacteriales o víricos. En la neumonía, *H. parasuis* se asume como un invasor oportunista secundario, causante de la enfermedad solo en asociación con otros agentes bacterianos o víricos.

Dicha relación fue evidente luego de que unos porcinos fueron inoculados por una infección accidental, con el virus de la Pseudorabia y *H. parasuis* serotipo 4 (Narita et. al, 1994). Sin embargo, reportes recientes indican que *H. parasuis* es el agente primario de infección en la bronconeumonía fibrinosupurativa (Pöhle y col. 1992; Barigazzi y col. 1994; Solano y col. 1998. En: Rapp-Gabrielson, 1995). El aislamiento de *H. parasuis* de animales con neumonía ha incrementado substancialmente en los últimos años y se cree está asociado con los incrementos en la prevalencia de neumonía por *Mycoplasma spp*, así como en los patógenos virales respiratorios, como el producido por en el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), el virus de la Influenza, el Circovirus Porcino Tipo 2 y el Corona

Virus Respiratorio Porcino (Rapp-Gabrielson, 1995).

El *H. parasuis*, en combinación con *Mycoplasma hyorhinis*, fue aislado de pulmones de porcino infectados con el virus del PRRS, en un 51,2% (Kobayashi y col, 1996). Sin embargo, impresiones clínicas en las que se asegura que PRRS es exacerbado por infecciones producidas por *H. parasuis*, no han sido probadas en modelos experimentales (Solano y col. 1997; Cooper y col. 1995. En: Rapp-Gabrielson, 1995).

La enfermedad de Glässer se ha descrito en un gran número de países de los cinco continentes, siendo muy diversa la distribución geográfica de los distintos serotipos, aunque siempre predominan algunos en particular; por ejemplo, según Rapp-Gabrielson y Gabrielson (1992), en los Estados Unidos predominan los serotipos 4 y 5, seguidos de los serotipos 2, 12, 13 y 14, con un 15% de cepas no tipificables. En el Japón, el serotipo que más predominó fue el serotipo 5 y de cepas NT fue de 68%. Igualmente en un estudio realizado por Rubies y col (1999) en España, se encontró que, los serotipos más frecuentemente aislados fueron el 5 (18.4%), el 4 (16%), el 2 (9,2%), el serotipo 13 (8%) y un número de cepas NT (29,3%). Sin embargo, los estudios llevados a cabo en Australia por Blackall y col. (1996), reportaron una incidencia superior, en los serotipos 4, 5 y 13. Mientras que en Alemania, Rapp-Gabrielson, (1995), reportó que el serotipo más predominante fue el 5, seguido del 4 y el 2; Sin embargo, halló que hubo un 26.2 % de serotipos NT, dentro de su estudio.

El *Haemophilus parasuis*, como ocurre con otros patógenos respiratorios porcinos, es un microorganismo muy lábil en las condiciones habituales de trabajo, en el medio ambiente y en los medios de cultivo. En una serie de experimentos llevados a cabo por Rodríguez Ferri y col, (2000) con el serotipo 5 (cepa Nagashaki), se puso de manifiesto que en un caldo de cultivo a base de BHI enriquecido con NAD y otros componentes, a temperatura ambiente, la viabilidad se anulaba a partir del cuarto día, prolongándose hasta el día 21 si se mantenía la temperatura a 4°C. Si se utilizaba suero, la viabilidad aumentaba sustancialmente, especialmente a 4°C en que, según las condiciones, podían recuperarse bacterias vivas hasta un mes después de iniciados

los experimentos, lo que demuestra que pese a su extrema labilidad, la bacteria sobrevive algún tiempo en condiciones de protección con materia orgánica.

1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

La enfermedad de Glässer se presenta básicamente en dos formas clínicas: aguda y crónica.

1.4.1. Forma Aguda.

Esta forma es típica de explotaciones donde no ha existido exposición previa: los síntomas clínicos ocurren unos días después de la exposición y de forma muy rápida. La presentación clínica depende de la localización de las lesiones.

Los signos clínicos más importantes se observan en lechones de 3 a 8 semanas de edad aunque se pueden observar en porcinos en crecimiento y engorde. En primer lugar los porcinos se deprimen rápidamente, presentan una temperatura elevada (40 – 41 °C) y dejan de comer. En otras palabras: aparece pirexia y apatía seguida de inapetencia y anorexia (Rodríguez y col, 2000).

Igualmente, se puede producir muerte súbita en lechones lactantes que se encuentran en buen estado de salud, cuando la inmunidad de las camadas de primerizas es baja, llegándose a presentar en algunos casos ocasionales tos.

La muerte suele ocurrir alrededor de los 2 - 5 días del inicio de la enfermedad. Posteriormente, la piel toma gradualmente una coloración rojo-azulada, momentos antes de morir, presenta poca motricidad, temblor y desorientación, como se observa en Figura 4. Es una enfermedad de morbilidad moderada (10 - 50%) y alta mortalidad (10 - 50%). En granjas libres de *H. parasuis* que se infectan por primera vez, el microorganismo puede llegar a causar un efecto devastador en animales de

cualquier edad y en cerdas produce una enfermedad similar al carbunco con elevada mortalidad (Rodríguez y col, 2000).

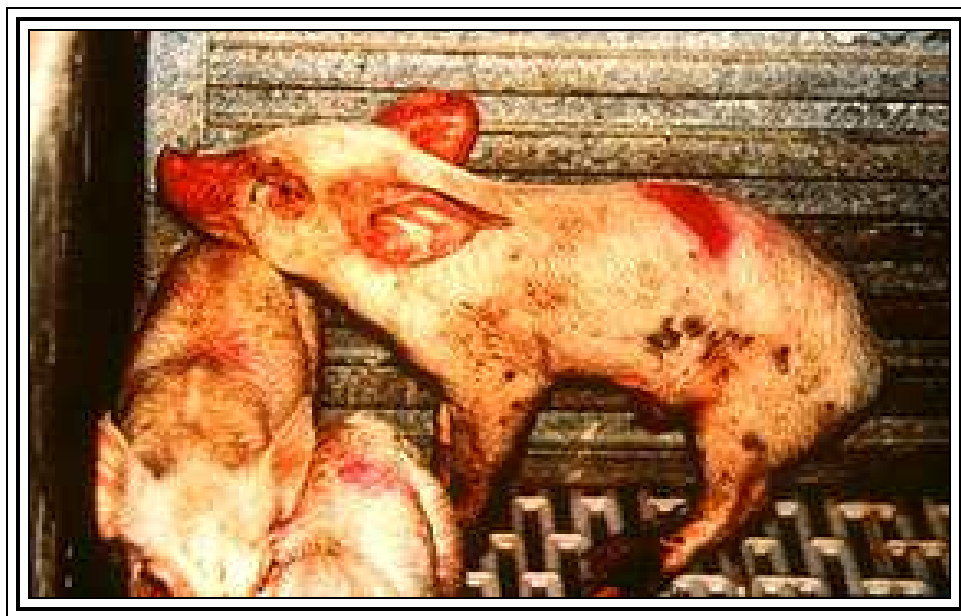


Figura 4. Imagen de un animal afectado por *H. parasuis*, el cual presentó los siguientes signos clínicos: poca motricidad, temblor, desorientación y piel con una coloración rojiza. Fuente: Rodríguez, y col, (2000).

Como agente secundario de una infección de virus del PRRS, la enfermedad se desarrolla normalmente en forma aguda, con síntomas respiratorios, nerviosos y locomotores. Se suele observar después de la mezcla de animales en las fases de destete y engorde. En estos casos, la enfermedad se expresa normalmente durante la 1 a la 3 semana después de su ingreso y dura varias semanas.

1.4.2. Forma Crónica.

Los porcinos pueden llegar a ser colonizados por diferentes microorganismos antes del destete (Pijoan y col, 1990), pero algunos de estos colonizadores tempranos son

potencialmente patogénicos (Pijoan y col, 1997).

En lechones lactantes puede observarse palidez y bajo crecimiento. Con una morbilidad del 10 al 15% y una mortalidad del 5 al 10%.

En lechones destetados y en porcinos de engorde, puede observarse bajo crecimiento, pérdida de peso y piel cubierta de pelo áspero. Cuando se produce pericarditis, se produce muerte súbita, a causa de una falla cardíaca. Igualmente es frecuente observar mayor incidencia de tos, disnea, artritis crónica y cojeras.

En animales adultos se aprecia que en cerdas primerizas se producen abortos, disnea e incoordinación y en verracos se produce cojera crónica (Rodríguez y col, 2000).

1.4.3. Lesiones Macroscópicas y Microscópicas.

El microorganismo *Haemophilus parasuis* ataca principalmente las superficies lisas de las articulaciones, epitelio del intestino, pulmones, corazón y cerebro. Observándose casos de poliserositis fibrinosa, pericarditis fibrinosa, peritonitis y meningitis purulenta.

También se producen casos de bronconeumonía (Figura 5), inflamación en las articulaciones, siendo el líquido de las mismas turbio con deposiciones de fibrina gris-amarillentas en las cavidades articulares, especialmente carpo y tarso. Normalmente, la pericarditis fibrinosa está asociada a signos de fallo cardíaco congestivo crónico (corazón agrandado).

Es posible observar el hígado y el bazo agrandados. En ocasiones se observan petequias en los riñones y presencia de fibrina en la cavidad abdominal como se aprecia en la Figura 6.



Figura 5. Imagen macroscópica torácica de un cerdo, donde se observan lesiones producidas por *H. parasuis*, características a una poliserositis fibrinosa y bronconeumonía en lóbulo apical. Fuente: Rodríguez, y col, (2000).

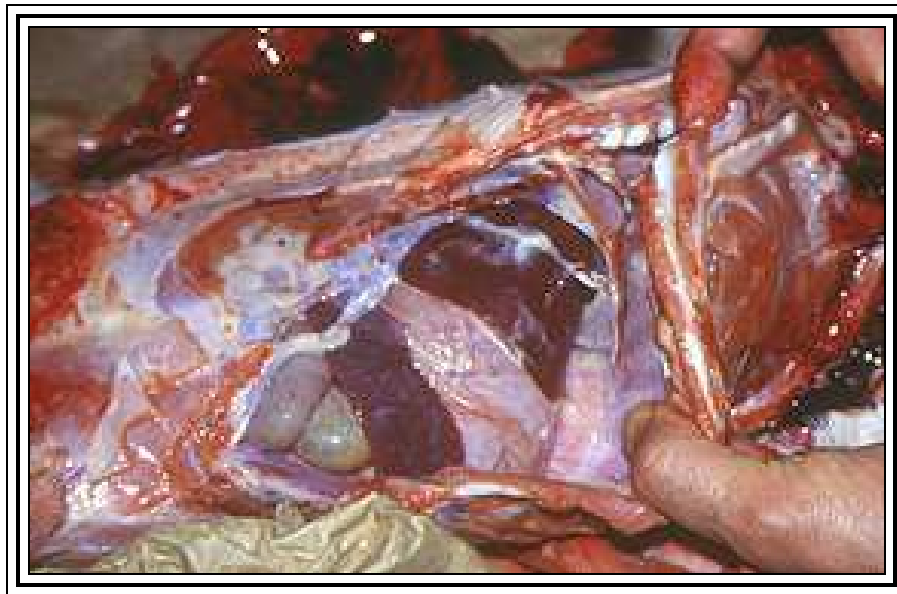


Figura 6. Imagen macroscópica abdominal de un cerdo, donde se observan lesiones producidas por *H. parasuis*, características por fibrina en cavidad abdominal. Fuente: Rodríguez, y col, (2000).

Por otro lado, se han descrito casos con presencia de cianosis, edema subcutáneo y pulmonar sin la inflamación típica de las serosas (Riley y col, 1977; Peet y col, 1983; Desrosiers y col, 1986). Existen otros casos con fascitis y miositis (Hoefling 1991) y rinitis purulenta (Gois y col, 1983; Vahle y col, 1995). Microscópicamente, el exudado consiste en fibrina, neutrófilos y macrófagos en menor cantidad (Vahle y col.1995).

- Las lesiones en la forma crónica son: Pericarditis, fallo cardiaco congestivo, meningitis, obstrucciones intestinales después de adhesiones fibrinosas e inflamaciones en las articulaciones (artritis crónica) (Figura 7a), siendo el líquido de las mismas turbio con deposiciones de fibrina gris-amarillentas en las cavidades articulares, especialmente carpo y tarso (Figura 7b).

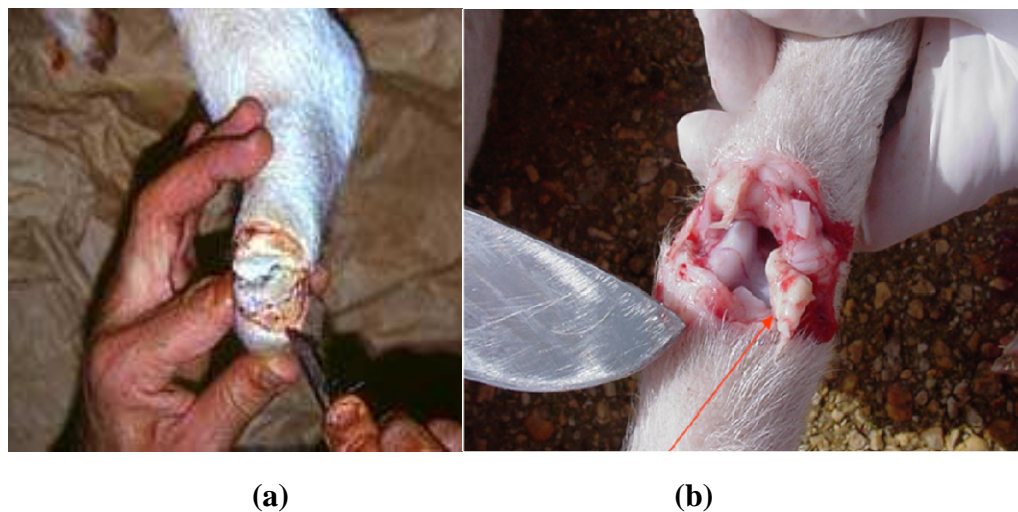


Figura 7. Imagen de una lesión macroscópica producida por *H. parasuis*. a) Líquido turbio con deposiciones de fibrina gris-amarillentas en las cavidades articulares; b) Presencia de artritis en una articulación de pata delantera en un cerdo. Fuente: Rodríguez, y col, (2000).

1.5. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de la patología causada por *H. parasuis*, presenta un desafío significativo debido a la existencia de cepas que han sido probadas como no-virulentas (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992) y la colonización temprana de cochinitos sanos con cepas del microorganismo. Las cepas virulentas y no virulentas pueden coexistir y por lo tanto es importante evaluar el potencial de virulencia de las cepas aisladas, especialmente si la estrategia de tratamiento ha fallado anteriormente. Desafortunadamente, los factores de virulencia de *H. parasuis* se desconocen y únicamente el órgano de donde se realice el aislamiento proporciona un indicador de la virulencia de la cepa (Olvera A, 2006b).

Por este motivo es necesario en el diagnóstico de laboratorio, la historia clínica, los datos epidemiológicos, los antecedentes del animal y la piara, como una herramienta muy útil en la orientación del diagnóstico de la infección producida por *H. parasuis* (Rodríguez y col, 2000).

El aislamiento es una cuestión capital, como en otros microorganismos del grupo, aunque no siempre sea una empresa fácil, a lo que se suma el hecho de que otros microorganismos de más fácil supervivencia y multiplicación en las mismas muestras clínicas, pueden 'ocultar' o 'enmascarar' la presencia de *H. parasuis*. Los mejores resultados se obtienen cultivando fluidos, exudados o líquidos procedentes de varios tipos de membranas serosas, incluyendo líquido cefalorraquídeo y sangre procedente del corazón, aunque no se observen lesiones sospechosas. Del mismo modo puede utilizarse, también, líquido ascítico, de la cavidad torácica, líquido pericárdico, líquido articular, hisopos nasales, traqueales ó de parénquima pulmonar. En igual medida proporcionan buen resultado hisopos ó escobillones impregnados en el material clínico descrito. El tiempo transcurrido entre la toma de muestras y las inoculaciones en medios de cultivo, para el aislamiento, posee gran importancia. Si se

prevé más allá de 24 horas de demora, es muy conveniente la utilización de hisopos con medio de transporte, que mejoran sustancialmente la supervivencia del agente y facilitan la recuperación (Rodríguez y col, 2000).

El diagnóstico del microorganismo está basado en los signos clínicos, pero esto a menudo se complica debido a la gran diversidad de síntomas que se pueden presentar (Moenning, V, 2000). Un diagnóstico diferencial deberá incluir infecciones bacterianas por septicemia causadas por, *Streptococcus suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Actinobacillus suis*, *Salmonella choleraesuis* var. *kunzendorf* y *Escherichia coli*. *Mycoplasma hyohinis* produce una poliserositis muy similar a la producida por *H. parasuis* con lesiones en cerdos de 3-10 semanas de edad (Olvera A, 2006b).

En cuanto a las pruebas de laboratorio que se pueden emplear para diagnosticar efectivamente a este patógeno se encuentran:

- **El aislamiento en cultivo bacteriológico:** Es la prueba estándar y técnica tradicional más importante para una posterior caracterización precisa de las cepas más prevalentes, que causan la enfermedad en una pira.
- **La identificación bioquímica:** Es primordial para lograr diferenciar a *H. parasuis* de los otros microorganismos de la familia *Pasteurellaceae*. Los aislamientos de la bacteria pueden ser caracterizados por serotipificación (Kielstein P, y col. 1992; Tadjine M, y col, 2004; Oliveira y col, 2004a).
- **Identificación molecular.** Debido que son altamente sensibles y específicas, son las técnicas más ampliamente utilizada en un laboratorio de diagnóstico. La genotipificación logra caracterizar los aislamientos de una manera más eficaz. La técnica de genotipificación emplea una ERIC-PCR a partir del consenso intergénico repetitivo de las *Enterobacterias*. Esto le permite identificar las

cepas que causan la enfermedad en las piaras afectadas (Oliveira y col, 2003).

1.6. METODOS DE DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO.

Para un diagnóstico definitivo en el laboratorio normalmente se necesita de la historia de la piara, los signos clínicos y la necropsia. Sin embargo, el aislamiento bacteriano es necesario para confirmación de un caso. El aislamiento de una cepa responsable de un brote es de gran interés ya que permite la implementación de otras pruebas como, susceptibilidad antimicrobiana, serotipificación o genotipificación.

1.6.1. Muestras Clínicas Adecuadas para el Aislamiento.

Para la confirmación en el laboratorio es necesario tomar muestras asépticas de serosas y fluidos. Una vez *H. parasuis* se encuentre fuera del cerdo, se vuelve un organismo frágil, fastidioso y de difícil recuperación para su aislamiento en medios sólidos. Además su presencia puede llegar a ser interrumpida por otros microorganismo patógenos de rápido crecimiento o por microorganismo contaminantes (Moser, 2005).

Según Moser (2005), las muestras deben ser tomadas en animales fallecidos ó recién sacrificados, que hallan mostrado signos de la enfermedad y que no hallan sido tratados con antibióticos, aunque otros autores encuentren el aislamiento de *H. parasuis* poco frecuente en porcino muertos (Oliveira, 2004b). En cuanto a aquellos animales que presentan signos febriles, tos y que muestren signos de neumonía, se consideraran como buenos candidatos para la obtención de una buena muestra. Si el animal presenta síntomas neurológicos, también puede ser un indicativo de enfermedad, pero sin embargo otros patógenos pueden llegar a causar las dos sintomatologías clínicas mencionadas.

Amano y col (1994), determinaron que el *Haemophilus parasuis* puede normalmente ser aislado de cavidades nasales, mientras que Oliveira y col (2001), comprobaron que

puede ser aislado del área de las tonsilas, Por otro lado Segalés y col, (1997), lograron aislar el microorganismo, en la tráquea de animales sanos (Vahle y col, 1997., Moller y col, 1990., Oliveira y col, 2002d., Oliveira, 2004b). Los hisopados y fluidos de lesiones sistémicas en casos de poliserositis fibrinosa, incluyendo fluido cerebroespinal en el caso de que se presenten signos nerviosos (Solano y col, 1997; Vahle y col, 1995. En: Olvera A, 2006b).

Los sitios ideales para el aislamiento de *H. parasuis* son: los pulmones, tejido del corazón ó sangre del corazón. Los hisopados de los órganos tienden a ser menos productivos, debido a problemas en la viabilidad y a la presencia de microorganismos de rápido crecimiento (Moser, 2005). A pesar de que *H. parasuis* produzca septicemia y se presume estar presente en la sangre durante una infección aguda, su aislamiento a partir de muestras de sangre en casos de campo es infrecuente (Amano y col, 1997., Oliveira, 2004b).

El envío intacto de los pulmones y el corazón sirve de ayuda en la recuperación del microorganismo, y minimiza la invasión por agentes contaminantes en el interior del tejido. El hígado y el bazo son también muestras que dan buen resultado y en especial si se envía al laboratorio el órgano completo o una pieza grande del mismo. Igualmente se recomienda el envío de los tejidos en un tiempo corto y en condiciones de congelamiento (Del Río M. 2003., Moser, 2005).

Según Oliveira (2004b), el sitio ideal para una exitosa recuperación es el cerebro (meninges), el pericardio, la pleura el peritoneo y las articulaciones. El tejido de los pulmones puede llegar a ser de utilidad cuando se ha observado previamente una pleuritis fibrinosa. En algunos casos, *H. parasuis* induce neumonía y los aislamientos a partir de pulmones con esta sintomatología pueden o no llegar a representar la cepa “problema” que esta afectando la piara (Oliveira y col, 2003; Oliveira, 2004b).

Igualmente son útiles al momento del muestreo, los cultivos de fluidos, exudados o líquidos procedentes de varios tipos de membranas serosas, incluyendo líquido cefalorraquídeo y sangre, procedente del corazón, aunque no se observen lesiones sospechosas. Del mismo modo puede utilizarse, también, líquido ascítico, de la cavidad torácica, líquido pericárdico o articular, hisopos nasales o traqueales o parénquima pulmonar, en porcino en la fase aguda de la enfermedad (Oliveira, 2004b).

Los hisopados de articulaciones o cerebro son considerados como muestras valiosas para la recuperación de *H. parasuis* y pueden ser menos afectadas por microorganismos competentes; obteniéndose luego de realizar algunos ensayos en estas muestras, cultivos puros de *H. parasuis*. Los hisopos estériles en medio de transporte Stuart ó Amies se recomiendan con la finalidad de incrementar la viabilidad y recuperación de los hisopos tradicionales de transporte. El sistema Amies mantiene mejor la viabilidad de *H. parasuis* que el sistema Stuart (Oliveira, 2004b). El hecho de que el sistema Amies sea más efectivo en el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos, se explica por la diferente composición entre estos dos sistemas de transporte; el medio Amies es una forma modificada del medio de transporte Stuart y además contiene una solución de sales de fosfato balanceada en un medio semisólido, que le brindan mayor especificidad (Del Río M, 2003).

Los hisopados deberán ser colectados de la superficie del órgano con exudados fibrinosos, puesto que estudios inmunohistoquímicos han demostrado que las células libres de *H. parasuis* se hallan concentradas usualmente en los exudados fibrinosos (Segales J, y col. 1997). Los hisopos deberán ser enviados lo antes posible, luego del muestreo y en condiciones de refrigeración (Moser, 2005; Oliveira, 2004b). Según Del Río M, (2003) reporta que el envío de tejidos intactos o muestras de fluidos se recomienda en el aislamiento rutinario de *A. pleuropneumoniae* y de *H. parasuis*, pero que cuyo el envío de estas muestras no es posible, se recomienda el sistema

Amies como buena opción de recolección de muestras clínicas que están destinadas a ser sembradas o procesadas en el laboratorio de diagnóstico en un tiempo no mayor a las 48 horas (Ej. Mucosa nasal, lavados intratráqueales y aspirados de articulaciones). Por encima de este tiempo, el sistema Amies parece que solo sirve para la recuperación de *H. parasuis*.

También proporcionan buen resultado hisopos o escobillones impregnados en el material clínico descrito, sin embargo su aislamiento es complicado debido a que no crece con facilidad en el laboratorio. Por este motivo, se recomienda sembrar las muestras en medios de transporte antes de enviar al laboratorio, puesto que el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y las inoculaciones en medios de cultivo, para el aislamiento, posee gran importancia. Si se prevé más allá de 24 horas de demora, es muy conveniente la utilización de hisopos con medio de transporte, que mejoran sustancialmente la supervivencia del agente y facilitan la recuperación. El envío a laboratorio se debe realizar con las adecuadas medidas de bioseguridad (Oliveira y col, 2002d, 2004b).

En cuanto a los fluidos de las articulaciones, peritoneo, pericardio y cavidad torácica, es mejor que se colecten usando jeringas estériles. *H. parasuis* vive más tiempo en el tejido completo que en los hisopos. Diferentes cepas de *H. parasuis* pueden llegar a ser aisladas de diferentes partes del cuerpo en el mismo cerdo, por este motivo las muestras deben ser enviadas en bolsas separadas (Oliveira, 2004b).

Los animales vivos pueden ser muestreados sin la necesidad de la eutanasia. El líquido sinovial, por ejemplo, puede ser colectado de las articulaciones inflamadas con el empleo de una jeringa y una aguja estéril y refrigeradas inmediatamente para el envío (Oliveira, 2004b).

El *H. parasuis* es sensible a la temperatura y por este motivo es indetectable en solución salina a 42°C luego de 1 hora y a 37 °C luego de 2 horas, y a 25°C luego de

8 horas (Morozumi T y col, 1982). Sin embargo a temperatura de refrigeración de (4°C), *H. parasuis* puede llegar a sobrevivir por un período relativamente prolongado de tiempo (Morozumi T y col, 1982; Oliveira, 2004b). Las muestras recolectadas para el aislamiento de *H. parasuis* deben ser enviadas al laboratorio de diagnóstico en el menor tiempo posible (1 a 2 días). Los hisopos, muestras de tejidos o fluidos recolectados con jeringas deberán ser enviados en un contenedor con pilas de hielo. Los tejidos deberán ser enviados frescos, sin necesidad de enviarse en formol (Oliveira, 2004b).

1.6.2. Aislamiento bacteriológico.

Desde la primera descripción de *H. parasuis*, el gold estándar para el diagnóstico de la enfermedad de Glässer's, continua siendo el aislamiento a partir de lesiones de un porcino con signos clínicos característicos de la enfermedad (Olvera A, 2006b). La necropsia se deberá realizar en animales no solamente severamente afectados, sino también en animales en la fase aguda de la enfermedad, antes de comenzar un tratamiento con antibióticos.

El *Haemophilus parasuis*, es un organismo frágil, fastidioso y de difícil recuperación en el laboratorio, porque es de crecimiento lento en medios sólidos y su presencia puede ser interrumpida por otros microorganismos patógenos de rápido crecimiento, presentes en la flora normal o en forma de contaminantes (Moser L, 2005). Por este motivo, requiere de un medio especial para su crecimiento puesto que solo alcanza a sobrevivir por cortos períodos de tiempo (8 horas) a temperatura ambiente (Morozumi T. y col, 1982).

El *H. parasuis* es una bacteria Gram negativa de morfología coco-bacilica, que requiere una fuente de dinucleótido adenina nicotinamida (NAD) o asimismo conocido como factor V, para su crecimiento. Este microorganismo no crece en medios regulares, como el Agar Sangre, a no ser que este suplementado con NAD,

como menciona en el Anexo 2. Para el aislamiento de *H. parasuis* se recomienda un medio base para Agar Sangre, enriquecido con triptosa, con un 5% de sangre de caballo desfibrinada y se añade β -NAD a los medios de cultivo, en una proporción aproximada del 0,01-0,025 % (Oliveira, 2004b).

Este elemento conocido como el factor V de crecimiento, puede ser agregado directamente al medio de cultivo en una presentación comercial conocida como Vitox (Oxoid). También se recomienda una forma natural de obtener el factor V o el factor X que esta presente en la sangre, directamente en algunas formulaciones que incorporan sangre calentada (agar chocolate); puesto que el factor V presente en la cascada de la coagulación de la sangre, se liberan al medio luego de que se produce una lisis de los glóbulos rojos. Igualmente se puede obtener un buen crecimiento del microorganismo mediante la utilización de estrategias de cocultivo, con una estría nodriza de otras bacterias productoras del factor, como *Staphylococcus aureus* o *St epidermidis*, a las que satelitiza en la superficie de los cultivos. Del mismo modo puede ser administrado colocando pequeñas tiras de papel o sensidiscos saturados con NAD en la superficie del agar sangre (Oliveira, 2007).

1.6.2.1. Técnica de la estría de estafilococos.

El *H. parasuis* solo crece en presencia cercana de una fuente de NAD, produciendo lo que comúnmente se llama “satelitismo”. El aislamiento de colonias pequeñas, translucidas, no hemolíticas, que muestran satelitismo en presencia de una fuente de NAD se sugiere como *H. parasuis* (Oliveira y col, 2004a).

El factor V, pueden aparecer como pequeñas colonias que asemejan gotas de rocío dentro de las zonas de producción de NAD alrededor de las colonias de otras bacterias. Esta técnica es particularmente adaptable al aislamiento de *Haemophilus parasuis* de LCR, cerebro, pulmón u otro tipo de muestra. Puede efectuarse una identificación presuntiva del microorganismo en cultivo de material ya sea exudado o

tejido, haciendo una estría estafilocócica.

El diagnóstico de diferenciación entre especies se realiza en base al análisis de requerimiento de los factores X y V, como se aprecia en la Tabla 2. La técnica consiste en preparar una suspensión de la cepa en caldo Mueller Hinton (MH) ó solución salina estéril, la cual se ajusta al tubo N° 5 del patrón de Mac Farland con una concentración de sulfato de bario de 0,5 M, la cual es equivalente a la producida por una población de bacterias de $3,7 \times 10^5$ CFU/ml. Posteriormente se siembra con un hisopo estéril en medio sólido agar tripticasa soya (TSA) o MH, y se colocan los discos o tiras de factores (X, V y XV) y se incuba a 37 °C durante 18 a 24 hrs, en 5 % CO₂. Para la interpretación de los resultados se considera positivo el desarrollo de colonias o de un velo en torno a cada factor ensayado (Trucco, 2002).

Tabla 2. Características diferenciales de las distintas especies de *Haemophilus*.

Fuente: Trucco, (2002).

Especie	Factores*	Hemólisis
<i>H. influenzae</i>	XV	-
<i>H. haemolyticus</i>	XV	+
<i>H. parainfluenzae</i>	V	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	V	+
<i>H. ducreyi</i>	X	-
<i>H. segnis</i>	V	-
<i>H. aphrophilus</i>	V	-
<i>H. paraphrophilus</i>	V	-

* Requeridos para su desarrollo *in vitro*.

Como se ha señalado, se puede utilizar también Agar chocolate u otras opciones como el Agar PPLO, el Agar de Levinthal, el Agar de Gilbride y el Agar de Rosendal (Agar Tripticasa de Soya), enriquecidos mediante la adición de 0.025 % de NAD, suero de caballo, extracto de levadura y glucosa. Cualquier fórmula puede hacerse selectiva mediante la incorporación de lincomicina o bacitracina.

En estos medios de cultivo se producen colonias muy pequeñas, de 0,5 - 1 mm. de diámetro (e incluso menos), no hemolíticas sobre Agar Sangre (lo que le permite diferenciarse de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* y otros) y traslúcidas, después de 24-48 horas de incubación (incluso 18 horas) a 37 °C en atmósfera aerobia o, en el caso de aislamientos o cultivos primarios, mejor en microaerofilia, con un 5% de CO₂, (Rapp-Gabrielson, 1999).

Los investigadores japoneses utilizan, con éxito, el medio HN-S (en caldo o agar), preparado a base de BHI suplementado con un 5% de suero de pollo y NAD y adicionado, según el caso, de agar. Solo el aislamiento proporciona seguridad en el diagnóstico, a lo que se suma el hecho de que un mismo animal puede estar infectado, simultáneamente, por varios serotipos diferentes, por lo que la recuperación a partir de distintos órganos adquiere una importancia particular.

Solo el aislamiento proporciona seguridad en el diagnóstico, a lo que se suma el hecho de que un mismo animal puede estar infectado, simultáneamente, por varios serotipos diferentes, por lo que la recuperación a partir de distintos órganos adquiere una importancia particular (Rodríguez y col, 2000).

1.6.2.2. Caracterización bioquímica de *H. parasuis*.

Es muy importante notar que otras bacterias dependientes de NAD, incluyendo los *Actinobacillus indolicus*, *Actinobacillus minor* y los *Actinobacillus porcinus*, pueden

llegar a ser aislados a partir de tejidos de porcinos (principalmente pulmones) y pueden llegar a ser identificados erróneamente como *Haemophilus parasuis* (Oliveira, 2007). Por este motivo, es esencial realizar a cualquier aislamiento presumible de *H. parasuis* una serie de pruebas bioquímicas para diferenciarlo de otros microorganismos NAD dependientes.

Bioquímicamente *H. parasuis* se caracteriza por una actividad metabólica discreta, sin embargo, en mi experiencia las pruebas que más facilitan la diferenciación entre microorganismos semejantes son la presencia de las enzimas catalasa, la ureasa y el índol, como se detalla en la Tabla 3.

- **Prueba de la Catalasa:**

La catalasa es una enzima que descompone al Peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, esta enzima es similar a la estructura de la Hemoglobina. Excluyendo al género *Streptococcus* y algunos otros la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas tienen Catalasa. La base de esta prueba es demostrar la presencia de la enzima Catalasa, colocando 2 o 3 gotas al cultivo. El resultado es positivo si en la colonia hay efervescencia.

Ejemplos:

- Catalasa (+): *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus parasuis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*.
- Catalasa (-): *Streptococcus spp.*

- **Prueba de la Oxidasa:**

Básicamente es la detección de la enzima Oxidasa, muy útil en la identificación de bacterias Gram (-). La reacción de la oxidasa se debe a la presencia del sistema de

citocromó oxidasa, la cual activa citocromós reducidos por oxígeno molecular, el cual transfiere un aceptor de electrones en el estado terminal del sistema de transferencia de electrones. El sistema de citocromós está generalmente presente en organismos aeróbicos. Un resultado positivo a la oxidasa consiste en una serie de reacciones en las cuales un componente auto-oxidable del sistema de citocromo es al final catalizado.

Utilizado Tetrametil-p-phenylendiamina al 1% hacia un cultivo bacteriano en un de papel filtro y un tubo capilar, obtenemos las siguientes reacciones, una reacción positiva se indica por la apariencia de un color púrpura oscuro en el papel en menos de 10 segundos, al contrario de la reacción negativa, que consiste en una ausencia de color púrpura.

Ejemplos:

- Oxidasa (+): *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*.
- Oxidasa (-): *Escherichia coli*

Este microorganismo tiene la capacidad de reducir los nitratos a nitritos, pero no es capaz de producir indol a partir de triptófano, ni descarboxilar la ornitina, la lisina o la arginina.

Es hábil en producir ácido de diversos sustratos como la glucosa, la manosa, la maltosa y la sacarosa; pero es incapaz de tomar como fuente de carbono a la xilosa, la lactosa, el manitol, la rafinosa, la melobiosa, la arabinosa. En el caso del inositol se obtiene un resultado variable según la cepa de estudio, igual que ocurre con la producción de SH². Igualmente *H. parasuis* no es apto en la producción de hemólisis y es negativo para la prueba de CAMP (Oliveira, 2007).

- **Ácido de la Glucosa:**

La mayoría de las bacterias de interés médico usan la glucosa como fuente de carbono, como parte importante de su metabolismo. Se determina si la bacteria usa la glucosa produciendo ácido y/o gas a partir de dicho carbohidrato. En un tubo con agua peptonada al 1% tapado, y un tubo de Durham, se inocula la bacteria por agitación teniendo cuidado de no mover el tubo de Durham e incubándolo 24 horas y 37°C se obtienen los siguientes resultados. Si la bacteria usa la glucosa producirá ácido y/o gas, por lo tanto el agua peptonada se observará rosa, si produce gas, se observará una burbuja en el tubo de Durham.

Ejemplos:

- Ácido y gas a partir de la glucosa: *Escherichia coli*, *H. parasuis*.
- Negativo a producción de gas: *Proteus stuartii*.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas específicas para la identificación de *Haemophilus parasuis*. Fuente: Oliveira, (2007).

Determinación	Resultado	Determinación	Resultado
Necesidad de NAD	+	Ácido de arabinosa	-
Hemólisis	-	Ácido de melobiosa	-
Ureasa	-	Ácido de Trealosa	-
Oxidasa	+	Ácido de celobiosa	-
Catalasa	+	Ácido de rafinosa	-
ONPG	+	Ácido de lactosa	-
Fucosidasa	+	Ácido de manitol	-
Producción de indol	-	Ácido de la glucosa	+
Crecimiento en agar MacConkey	-	Ácido de la manosa	+
Reducción de Nitratos	+	Ácido de la Maltosa	+
Prueba de CAMP	-	Ácido de la sacarosa	+
Inositol	+/-	Ácido de la Xilosa	-
Bilis Esculina	-	Producción de SH ² .	+/-

La diferenciación con otros microorganismos próximos puede llevarse a cabo mediante procedimientos de cultivo convencionales e incluso mediante la utilización de procedimientos rápidos en micro celdillas complementados con la información proveniente de los medios con sangre (hemólisis y CAMP). A este respecto, es conveniente la diferenciación de *A. minor*, *A. indolicus*, *A. porcinus* y *Haemophilus taxón C* que, no siendo patógenos, comparten los mismos lugares de aislamiento primario (Oliveira, 2007).

En lo posible, el aislamiento debe ir seguido de la tipificación serológica mediante la técnica de inmunodifusión en gel, normalizada, empleando una preparación calentada del antígeno. Debe recordarse, al respecto, que la prueba disponible, dista mucho de ser un procedimiento óptimo de clasificación, a la vista del gran porcentaje de cepas no tipificables, descritas por cualquiera de los autores que han referido resultados de tipificación en todos los países.

Las mínimas pruebas bioquímicas, requeridas para la diferenciación de *H. parasuis* con otros *Actinobacillus* pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*, se describe en la Tabla 4. En la cual se indicó con un paréntesis, las cepas que presentaron la misma homología en su ADN, de acuerdo con la hibridación de ADN-ADN. También se observan las características fenotípicas de las cepas referenciadas en estudios anteriores por Møller y col, 1990, 1996; Kielstein y col, 2001. Oliveira y col, 2004a y Oliveira, 2007a.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas* mínimas necesarias para la diferenciación de *H. parasuis* de otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* NAD-dependientes, aislados a partir del tracto respiratorio en porcino. Fuente: Møller y col, 1990, 1996; Kielstein, y col. 2001; Oliveira, 2007.

Bioquímica	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> ^a	<i>Actinobacillus minor</i> ^b	<i>Actinobacillus porcinus</i> ^b	<i>Actinobacillus indolicus</i> ^b	<i>Haemophilus parasuis</i> ^a
Dependencia factor V	+	+	+	+	+
Hemólisis	+	-	-	-	-
CAMP	+	-	-	-	-
Ureasa	+	+	-	-	-
Indol	-	-	-	+	-
Catalasa	-	-	-	+	+
ONPG	+	+	+	+	+
Descarboxilación lisina	-	-	-	-	-
Descarboxilación ornitina	-	-	-	-	-
Formación de Ácido					
Glucosa	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+(d)	+	+
Manosa	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	-(d)	+	+
Ramnosa	-	-(d)	-	-(d)	-
L-arabinosa	-	-	-(d)	-	-
Xylosa	+	- ^c	+(d) ^c	-(d)	-
Sucrosa	+	+	+	+	+
Lactosa	-	+	+	-	-
Trealosa	-	d	d	-(d)	-
Maltosa	+	+	+(d)	+	+
Manitol	+	-	+	-	-
Sorbitol	-	-	+(d)	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	+(d)	-	-
Rafinosa	-	+	+(d)	+	-
Salicina	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-

* Las reacciones son definidas como positivas (+) o negativas (-).

^a. Según Møller y col. (1990). ^b. Según Møller y col. (1996). ^c. Cepa positiva de *A. minor*

probada como negativa (Kielstein y col, 2001) en la fermentación de la xilosa.

^d. Reacciones diferentes.

Otras bacterias NAD-dependientes, no-hemolíticas y ureasa negativa han sido aisladas del tracto respiratorio superior de porcino. Estos aislamientos fueron descritos por primera vez como taxones C, D, E y F y solo podían ser diferenciados de *H. parasuis* luego de extensas pruebas bioquímicas (Tabla 4). Los taxones D, E y F se han encontrado como parte de la flora normal en el tracto respiratorio superior (Møller y col, 1990), pero también han sido aislados a partir de tejido de pulmón (Rapp-Gabrielson, 1992; Blackall y col, 1994). Sin embargo, en porcinos gnotobióticos¹ infectados nasalmente con los taxones D y F, únicamente resulto en una colonización de las amígdalas, a excepción de un cerdo que mostró ataxia media y en donde el taxón D, pudo ser aislado nuevamente del cerebro (Chiers y col, 2001; Kielstein y col, 2001).

En algunos lugares se practica un método de fijación del complemento para la tipificación, pero plantea el grave inconveniente de numerosas reacciones cruzadas entre serotipos, lo que unido a la posibilidad de que en la misma explotación y aún en el mismo animal circulen distintos serotipos, representa un procedimiento muy complicado de usar y extraer conclusiones prácticas útiles.

La detección directa del antígeno puede intentarse mediante métodos inmunohistoquímicos, por ejemplo, un sistema avidina-biotina, como se ha demostrado en el caso del serotipo 5, en condiciones experimentales, aunque los resultados dependerán estrictamente de la calidad de los anticuerpos utilizados (policlonales o monoclonales). Tiene la ventaja de que pueden aplicarse a tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, pero no resuelve reacciones falsamente positivas con *A. pleuropneumoniae*.

¹ Animales con una microbiota conocida, que se han obtenido a partir de animales libres de microorganismos. Se utilizan para el estudio de las funciones de la microbiota normal.

1.6.3. Estudios de sensibilidad antimicrobiana.

Los antibióticos son sustancias químicas sintetizadas parcial o totalmente en laboratorio que inhiben el crecimiento e impiden el desarrollo y actividad de ciertos microorganismos. Walkman en 1942, definió los antibióticos como sustancias químicas producidas por microorganismos, que inhiben o destruyen otros microorganismos (Foley y col., 1999. En: Mejía D.C, 2007).

Los ensayos de susceptibilidad están indicados para apoyar la quimioterapia antimicrobiana de tratamientos en procesos infecciosos por bacterias en las que la identidad del microorganismo no es suficiente para predecir en forma confiable su susceptibilidad. Estos ensayos son a menudo indicados cuyo se piensa que el organismo causante pertenece a una especie capaz de mostrar resistencia a los agentes antimicrobianos más comúnmente usados. Los mecanismos de resistencia incluyen la producción de enzimas que inactivan la droga, alteran el objetivo, o alteran la acción. El rango de actividad de un antimicrobiano se denomina espectro, término usado para definir los géneros y especies frente a los cuales a demostrado ser activo (Mejía D.C, 2007).

Los efectos de un antimicrobiano pueden ser bacteriostáticos o bactericidas; en los primeros la máxima concentración no tóxica que se alcanza en suero y tejidos impide el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, sin destruirlos. En el caso de los bactericidas, estos ejercen acción letal sobre los microorganismos, por lo que éstos pierden irreversiblemente su viabilidad o son lisados (Mejía D.C, 2007).

Los mecanismos de acción de los antimicrobianos son importantes y diversos. Algunos inhiben la síntesis de la pared celular, otros alteran la permeabilidad celular, otros inhiben la síntesis proteica y por último otros actúan como inhibidores de la síntesis de ADN y ARN.

La medicación de animales sólo es efectiva en aquellos animales con sintomatología clínica. Además su utilización en portadores subclínicos no es aconsejable ya que no reduce la prevalencia, ni la magnitud, ni el período de excreción del patógeno (Dahl y col, 1997) e incluso puede contribuir notablemente a la aparición de multi-resistencias (Mateu, 2001).

En los últimos años se ha observado en gran variedad de bacterias resistentes a antibióticos, lo cual ha causado una emergencia en salud pública, debido a las muchas infecciones que estas producen en animales de consumo humano (Aarestrup, 1999; En: Aarestrup y col, 2004). Este fenómeno incluye organismos pertenecientes al grupo *Haemophilus* (Watts y col, 1994; En: Aarestrup y col, 2004).

El control de la enfermedad de Glässer's puede llevarse a cabo con el empleo de una pronta y adecuada vacunación; sin embargo, se ha observado que se afecta negativamente el desarrollo de esta protección cruzada, debido a la gran diversidad de serovares y al elevado número de cepas aisladas no tipificables que se han reportado en los últimos años (Oliveira y Pijoan, 2004a).

Por este motivo, la terapia con antimicrobianos es todavía necesaria en el tratamiento de brotes de la enfermedad de Glässer's, junto con otras medidas de contención como es el hecho de limitar dichos brotes, con un buen manejo de los animales, incluyendo una adecuada protección calostrual. Existen pocos reportes de susceptibilidad antimicrobiana; sin embargo, en Europa se han hecho avances en este tema en los últimos años (Wissing y col, 2001; Aarestrup y col., 2004; San Millán y col., 2006; Nedbalcova y col., 2006).

En un estudio realizado en Inglaterra y España, por De la Fuente y col, (2007), se observó que 30 cepas analizadas de *H. parasuis* de procedencia española, fueron susceptibles únicamente a florfenicol y resistentes a penicilina, ampicilina,

oxytetraciclina, eritromicina, tilmicosin, tiamulin y trimetropin-sulfametoxazole, además existían indicios de una resistencia adquirida para clindamicina, sulfonamidas y tilosina tartrato. En contraste, las 30 cepas de origen británico, fueron susceptibles a la penicilina, ceftiofure, eritromicina, tilmicosin, enrofloxacin, florfenicol y la mayor resistencia se observó en neomicina con (20%). Por lo que se determinó que en Inglaterra las cepas de *H. parasuis* son susceptibles a los antimicrobianos rutinariamente empleados en el tratamiento de enfermedades respiratorias porcinas, en comparación de España. Por otro lado, Aarestrup y col, (2004), demostraron en su estudio, que las cepas en Dinamarca son en términos generales muy susceptibles a los agentes antimicrobianos usados en el tratamiento de las infecciones causadas por *H. parasuis* y *H. somni*.

El uso apropiado de los antimicrobianos se considera un componente importante en el manejo de infecciones bacterianas como la producida por *H. parasuis*, en la que se requiere un tratamiento pronto, puesto que este agente es capaz de matar porcinos muy rápidamente (MacInnes y col, 2003). Además se requiere un buen conocimiento del grado de susceptibilidad de la cepa infectante contra el agente antimicrobiano, debido a la resistencia emergente que se ha llegado a observar en varios organismos, incluyendo aquellos causantes de enfermedades respiratorias en porcino, tales como *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Gutiérrez-Martín y col., 2006) o *Pasteurella multocida subsp. multocida* (Vera-Lizarazo y col., 2006), (De la Fuente, y col, 2007).

Existen dos metodologías para evaluar la eficacia de un microorganismo frente a un antibiótico: **1)** El método de difusión en caldo y **2)** El método de difusión en gel de agar, como se describen a continuación:

- **Método de difusión de disco en gel de agar: Técnica de Kirby-Bauer.**

Es un tipo de prueba de sensibilidad en la cual se utilizan discos de papel filtro impregnados con varios agentes antimicrobianos, como los mencionados en la Tabla 5, según lo recomendado por la NCCL (2002), para *H. parasuis*. Posteriormente los filtros son colocados sobre la superficie de una caja o placa petri con agar, previamente inoculada con la bacteria procedente del animal (Coyle, M. 2002).

Después de una noche de incubación, las zonas de inhibición alrededor del disco son medidas e interpretadas como sensible, intermedio o resistente (basada en criterios pre-establecidos), (Coyle, M. 2002).

Los pasos generales reportados para esta metodología son:

- Preparación del inóculo: consiste en una suspensión directa en caldo, cuidando de obtener una turbidez equivalente al tubo No. 5 del patrón de la escala de Mac Farland, como se observa en el Anexo 4. Este es un punto considerado crítico.
- El medio recomendado por la NCCLS es el HTM (*Haemophilus test medium*); sin embargo, por su alto costo, en muchos laboratorios se continúa utilizando medio de agar chocolate, con resultados muy similares a los obtenidos en HTM, especialmente para ampicilina, cloranfenicol y asociaciones de amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilinasulbactam. Incubación durante 18 a 24 hrs., a 37°C con 5% CO₂.
- Respete el número de discos recomendado por placa, dado que tiende a producir grandes halos.

Tabla 5. Selección de antimicrobianos primarios a evaluar en cepas de *Haemophilus parasuis*. Recomendaciones de NCCLS 2002. Fuente: Coyle, M. 2002.

Antimicrobianos	Carga del Disco (μg)	Halo de inhibición (mm)		
		Resistente	Susceptibilidad Intermedia	Susceptible
Ampicilina	10	<18	19-21	>22
Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	<19	-	>20
Cotrimoxazol (trimetoprim/sulfa)	1.25/23.75	<10	11-15	>16
Cloranfenicol	30	<25	26-28	>29
Cefuroxima	30	<16	17-19	>20
Cefotaxima	30	-	-	>26
Metropenem	10	-	-	>20
Azitromicina	15	-	-	>12
Claritromicina	15	<10	11-12	>13
Cefaclor	30	<16	17-19	>20
Ciprofloxacina	5	-	-	>21

- **Método de difusión en caldo: La concentración mínima inhibitoria (CIM)**

La concentración mínima inhibitoria (CIM) de un agente antimicrobiano, es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Determinamos la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano.

Se emplearon los criterios de interpretación del NCCLS y los resultados son interpretados como susceptible, intermedio o resistente (Coyle, M. 2002).

Este es el método de referencia recomendado por la NCCLS, reservado para casos especiales y estudios epidemiológicos de resistencia. Consiste en micro dilución en caldo HTM, que constituye el *gold standard* y epsilometría (E-test), como alternativa en situaciones clínicas. Al igual que en el método de difusión, se debe preparar un inóculo con suspensión directa de colonia e incubarlo a 35 °C durante 24 hrs sin CO₂, (Coyle, M. 2002).

1.7. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR.

La introducción de métodos moleculares, tales como la PCR, se considera una ventaja mayor en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, en particular cuando se trata con microorganismos de crecimiento lento (Olvera A, 2006b).

1.7.1. Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, para *Haemophilus parasuis* (PCR-Hps).

En 1983 fue desarrollado por Kary B. Mullis, un proceso relativamente simple de amplificación *in vitro* de un número de fragmentos específicos de ácidos nucleicos presentes en una muestra, el cual denominó Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Desde su introducción la PCR, que permite ampliar por vía enzimática millones de copias de un fragmento específico de ADN, se vislumbró como una técnica que podía revolucionar por su rapidez y sensibilidad el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Después de unos años, la PCR ha llegado a ser el método más utilizado para la amplificación de los ácidos nucleicos en los laboratorios de investigación y diagnóstico (De la Rosa, 2002).

En este proceso se utilizan dos cebadores (iniciadores) que enmarcan la secuencia a amplificar y la polimerasa de ADN termoestable denominada *Taq*, procedente del *Thermus aquaticus* o del *Thermus Thermophyllus*. La técnica consta de tres pasos que se realiza a 94°C y su función es que el ADN presente en la muestra actúe como molde de replicación. El segundo paso se basa en la unión de los cebadores a sus secuencias complementarias (anillamiento) y en el tercer paso, el de amplificación o extensión, se produce la replicación del molde de ADN por la *Taq polimerasa* a partir de los cebadores en ambas cadenas simultáneamente en dirección 5' a 3'. Esas tres etapas representan un solo ciclo de la PCR, como se aprecia en la Figura 8. Cuando estos ciclos se repiten varias veces (25 a 45), el resultado es el incremento exponencial de un producto específico de la PCR que puede ser detectado por diversas técnicas tales como electroforesis en gel de agarosa, southern o dot-blot y algunos ensayos tipo ELISA (De la Rosa, 2002).

Esta técnica, se ha convertido en una prueba estándar en muchos laboratorios de diagnóstico. Es comúnmente vista como una técnica ultra-sensible y específica. Cuando se diseña y se implementa adecuadamente, la PCR es una prueba de considerable valor en el diagnóstico veterinario rutinario. Sin embargo, así como tal es fácil y útil, pero la PCR presenta su propio set de inconvenientes (Harmon K, 2004).

Teniendo en cuenta que las muestras que se procesaban procedentes de porcino muertos, eran frecuentemente negativas en cultivos bacteriológicos (Oliveira, 2004b). Se estimó desarrollar una técnica de PCR específica para *H. parasuis* en muestras clínicas (PCR-Hps); con el fin de mejorar la eficacia y velocidad de diagnóstico de este agente en los laboratorios de medicina veterinaria. Esta prueba permite velocidad y sensibilidad en cultivos puros y muestras clínicas, detectando incluso los microorganismos no viables, lo cual representa una ventaja si se compara con la microbiología tradicional (Oliveira y col, 2001).

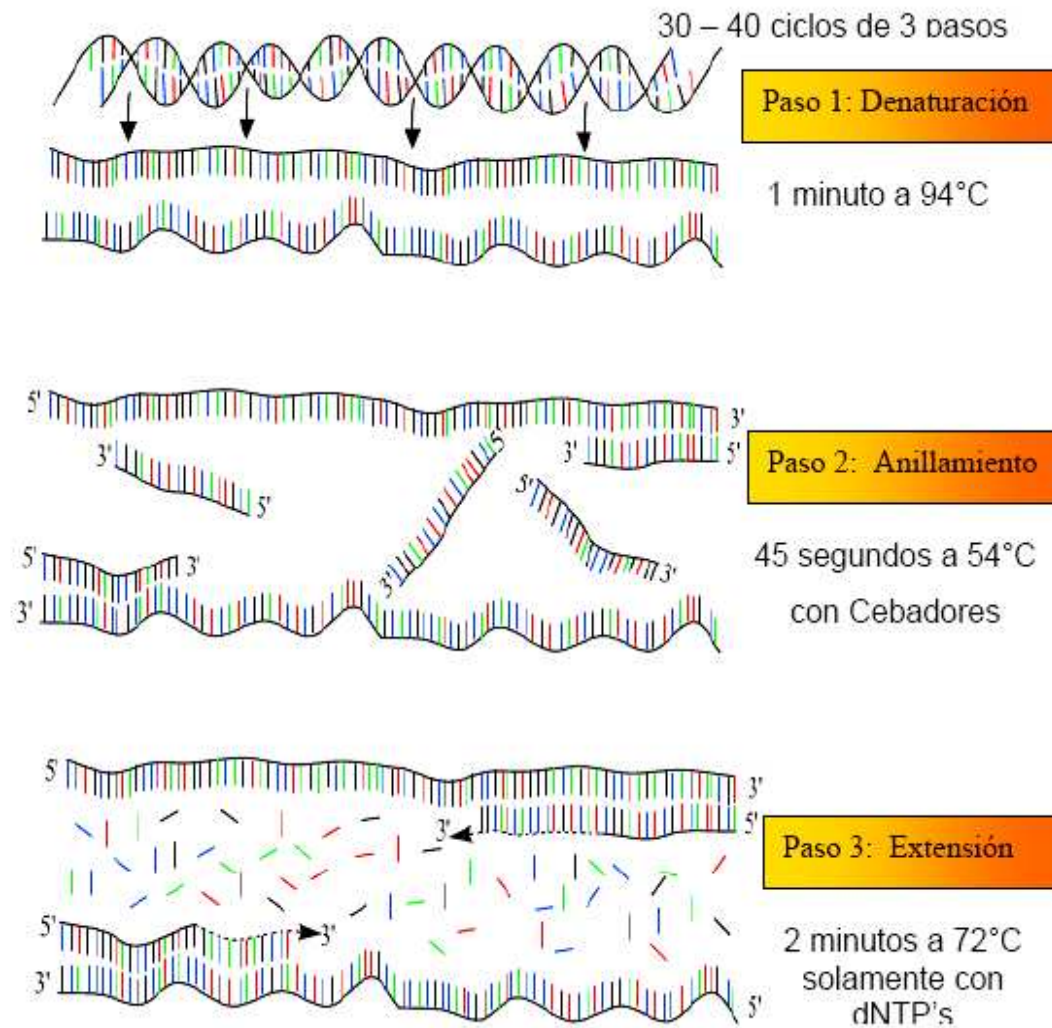


Figura 8. Representación esquemática de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se observa los tres pasos que conforman la PCR, la denaturación de las hebras de ADN a 94°C, seguido por el anillamiento de los oligonucleótidos a las secuencia blanco a 54°C y por último la extensión de la secuencia con los deoxynucleotidos a 72°C de 5' a 3'. Fuente: (Vierstraete A, 1999).

Debido al crecimiento lento y fastidioso de *H. parasuis*, el desarrollo de una prueba específica de PCR hace suponer una mejoría en la detección de esta bacteria (Oliveira y col, 2001).

El genoma bacteriano de *Haemophilus parasuis* consta de pequeñas secuencias de subunidades ribosomales de RNA 16s (GenBank M75065); Oliveira y col, (2001), compararon dichas subunidades contra 51 secuencias 16S rRNA de bacterias similares con la finalidad de encontrar homología, estas bacterias las escogieron por ser frecuentemente aisladas de tejidos de suinos y para tal fin usaron el programa de análisis bioinformático BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Posteriormente, las pequeñas secuencias que obtuvieron del genoma de *H. parasuis*, fueron alineadas y determinaron al final del estudio, dos regiones especie-específicas para este genoma. Con base en esto lograron diseñar dos iniciadores, uno que corriera hacia delante HPS-F [Forward] y otro hacia el lado contrario HPS-R [Reverse]. El tamaño estimado de amplificación para los productos de esta PCR fue de 821 pares de bases (pb), en la región que codifica para el RNA 16s (Oliveira y col, 2001).

La especificidad y sensibilidad de la técnica de PCR, se centra en los iniciadores empleados y en los diseños de prueba. Para que sea más efectiva debe tener como objetivo una región altamente conservada que sea específica para el agente de interés. Existen muchos programas o software en el mercado que sirven para diseñar los iniciadores específicos y pruebas de trabajo, pero es todavía necesario escoger un objetivo apropiado para mayor especificidad. Con la finalidad de incrementar la sensibilidad, se busca que la secuencia objetivo este presente en el agente a estudiar en un número múltiple de copias, lo cual no es siempre posible (Harmon K, 2004).

En la PCR, si la secuencia objetivo esta presente en la muestra inicial, se logra un producto amplificado de alto nivel, que puede ser fácilmente detectado. Si el

producto de PCR es detectado durante o después de la amplificación, la muestra se considero como positiva para el agente en estudio y la falta de detección del producto, se considera como un indicativo de que la muestra es negativa (Harmon K, 2004).

En este trabajo se empleó el método de extracción de ADN, de acuerdo a la metodología de proteínasa K y fenol-cloroformo-isoamílico, reportada por Sambrook y col, (1989); Lo y col, (1998); Oliveira y col, (2001) y San Millan y col, (2007), con la finalidad de que las muestras se lisaran bajo altas condiciones denaturantes. La Proteínasa K, pertenece a la familia de las serin proteasas, obtenida de *Bacillus subtilis*. Es una proteínasa sérica de amplio espectro, es una enzima libre de actividad ADNsa y ARNsa, tiene actividad endo y exoproteolítica y además se emplea en la digestión general de proteínas, para que se destruyan las membranas nucleares en las muestras biológicas y así se libere a la solución, los ácidos nucleicos de interés (Lora A, 2002).

La digestión con Proteínasa K se realiza en presencia de EDTA y no es inhibida por urea (1-4 M), SDS, citrato, acido indolacético ni ningún otro inhibidor de serin proteasas. Usualmente para inactivarla se eleva la temperatura por encima de los 95°C por 10 min.

La electroforesis realizada en gel de agarosa, es el método estándar de detección de los productos de PCR, pero en los últimos años la técnica de PCR en tiempo real; se basa en la producción de fluorescencia durante las reacciones de la PCR, se ha convertido en una alternativa atractiva y popular. Sin embargo esta técnica es más difícil de optimizar y la inversión inicial en instrumentación es muy alta comparada con los geles tradicionales para PCR. Otra técnica usada en los laboratorios de diagnóstico veterinario son las reacciones múltiplex de PCR. La cual combina reactivos de múltiples agentes o subtipos de agentes en una sola prueba, lo cual reduce la cantidad de trabajo y costo por agente. Sin embargo esta PCR múltiplex es

más difícil y su sensibilidad es variable (Harmon K, 2004).

Al evaluar la técnica de PCR, se debe recordar que este ensayo, sirve para evaluar la presencia de una pequeña porción de ácido nucleico, en un organismo de interés. Un resultado positivo indica que el ácido nucleico específico para el organismo objetivo se encuentra presente en la muestra, pero que no necesariamente es un reflejo de la virulencia del organismo, ni tampoco sirve para delimitar, el punto en el que este organismo sea una fuente de infección.

Adicionalmente, debido a la naturaleza del ensayo, la prueba se desarrolló sobre una muy pequeña porción del total de la muestra. Por lo tanto, la presencia del agente en una pequeña área localizada de un tejido o en una pequeña cantidad de cultivo, puede llevar a resultados falsos negativos. En algunos casos, es mejor utilizar múltiples pruebas (PCR, FA, ELISA, IHC, aislamiento viral o bacteriano, etc.) para confirmar la categoría en la que se encuentra determinado animal o piara (Harmon K, 2004).

La validación de una técnica de PCR requiere extensas pruebas para asegurar la adecuada sensibilidad y especificidad. A menudo, la falta de muestras clínicas de status conocido, puede ser un obstáculo en la validación adecuada de cualquier prueba y no es la excepción en la validación de una prueba de PCR. Adicionalmente a la fecha no hay una definición estandarizada o procedimiento a seguir en la validación de la prueba de PCR, de tal manera que los criterios de validación pueden llegar a variar entre un laboratorio y otro (Harmon K, 2004).

Con la finalidad de evaluar la sensibilidad de esta técnica de PCR, se han realizado investigaciones en los últimos años, para delimitar la concentración mínima de ADN de *H. parasuis* que es detectable. Primero ellos tomaron una serie de 10 diluciones a un cultivo de *H. parasuis* (cepa Nagasaki, serotipo 5) que se encontraba a una concentración de 1×10^9 UFC/ml y posteriormente se le corrió una PCR. Un mililitro de cada dilución fue usado para la extracción de ADN, (Oliveira y col, 2001).

La sensibilidad de la técnica de PCR para *H. parasuis*, puede detectar una concentración mínima 10^2 UFC/ml de *H. parasuis* y un mínimo de 0.69 pg del ADN patógeno (Oliveira y col, 2001). Pero según Sahagún y col. (2006), esta técnica de PCR tiene la sensibilidad de detectar al microorganismo en muestras de ADN purificado con una concentración de 10 pg, mientras que en cultivos puros de *H. parasuis*, se detecto 0,063 UFC/ml. Igualmente la sensibilidad de esta PCR a partir de tejidos inoculados fue de 156 UFC/ml

Por otro lado, Oliveira y col, (2001), realizaron para la determinación de la prueba de especificidad, diluciones seriadas del ADN extraído, para determinar la cantidad mínima de ADN que puede ser detectado por la prueba. La especificidad de la prueba de PCR la determinaron evaluando 31 aislamientos de *H. parasuis*, en los que incluyeron 12 diferentes serotipos y 19 aislamientos de campo, que habían sido identificados bioquímicamente como *H. parasuis*. Igualmente evaluaron 32 aislamientos que representaban 15 diferentes especies bacterianas, comúnmente encontradas en enfermedades porcinas. Del mismo modo con el fin de obtener mejores resultados en la prueba de especificidad de la PCR, emplearon tejidos a partir de un porcino libres de patógenos (SPF) y de especies no relacionadas.

La técnica de PCR es capaz de detecta a *H. parasuis* en muestras que contengan mezclas de bacterias como, *Actinobacillus suis*, *A. pleuropneumoniae*, *A. indolicus*, *A. minor*, *A. porcinus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli* y *Streptococcus suis* (Oliveira, 2007). Por este motivo una prueba de especificidad debe evaluar a estos microorganismos con la finalidad de que se generen resultados negativos por PCR y se determine la especificidad de la prueba en el laboratorio para *H. parasuis* (Oliveira, 2007). En México Sahún-Ruiz y col. (2006), determinaron en su investigación, la especificidad de los iniciadores para *H. parasuis*, usando ADN de *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* tipo A, *Actinobacterium pyogenes* y *Echerichia coli*.

Esta técnica de PCR es también exitosa en detectar a *H. parasuis* a partir de muestras procedentes de lesiones severas, que habían mostrado por aislamiento bacteriológico, resultados negativos debido a su mayor sensibilidad (Oliveira, 2007).

En la interpretación de los resultados de la prueba de PCR, se considera un resultado positivo, cuando el ADN de *H. parasuis* es detectado en la muestra clínica y el diagnóstico de una infección basado en este resultado es válido. Sin embargo, el aislamiento se debe someter a una prueba de susceptibilidad antibiótica, serotipificación o genotipificación. Un resultado positivo por PCR, es significativo en muestras de cavidad nasal, tráquea y pulmones, únicamente cuando la pira ha sido reportada como negativa para *H. parasuis*. Las muestras de *H. parasuis* que van a ser sometidas para la prueba de PCR deben incluir exudados fibrinosos, presentes en la pleura, pericardio, peritoneo, bazo, hígado, articulaciones y meninges (Oliveira, 2007). Estos exudados fibrinosos deben ser colectados usando un hisopo. Debido a que no se observan lesiones graves en casos de meningitis, se deberá realizar un hisopado de la superficie del cerebro para aislamiento bacteriano y pruebas de PCR (Oliveira, 2007).

1.7.2. Métodos de diagnóstico genotípico para *H. parasuis*.

La mayoría de los estudios epidemiológicos de las infecciones producidas por *H. parasuis*, están basados en información de serotipificación (Morikoshi y col, 1990; Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992; Rapp-Gabrielson y Gabrielson, 1992; Blackall y col, 1996; Rubies y col, 1999 y Raffiee y Blackall, 2000, En: Oliveira y col, 2004a). Sin embargo, en los últimos años se han comenzado a remplazar por estudios genotípicos, con la finalidad de superar la limitaciones encontradas en la serotipificación en estudios epidemiológicos de las infecciones producidas por *H. parasuis*.

La identificación de especies utilizando las secuencias del ADN se ha incrementado sustancialmente a partir de proyectos como la iniciativa para la genotipificación. La premisa bajo la cual se selecciona la genotipificación, es que estas regiones del ADN presentan una evolución rápida y fácil de detectar, lo que puede producir identificadores únicos para las especies. Investigadores en todo el mundo están trabajando para incrementar el número de especies que pueden ser identificadas mediante la creación de un archivo abierto de secuencias de ADN asociadas con los especímenes de las colecciones de referencia. Las nuevas herramientas de búsqueda bioinformática pueden localizar a partir de una muestra, la secuencia más parecida y proveer de esta manera una identificación apropiada.

La técnica de genotipificación, se refiere al proceso de determinación de un genotipo de un individuo específico, por medio de un ensayo biológico. Actualmente existen varios métodos para realizar este procedimiento, que incluyen: PCR, secuenciación de ADN e hibridización de ADN. Debido a limitaciones en la tecnología, casi todos los resultados de genotipificación son parciales, esto quiere decir que sólo una pequeña fracción de un genotipo individual es determinada. En general, la genotipificación del ADN es usada para identificar especies, mientras que los métodos como las huellas génicas son utilizados para identificar poblaciones, parentesco e individuos.

Aunque, la información existente sobre las secuencias genómicas de *H. parasuis* es muy limitada, varios grupos de investigadores han desarrollado y mejorado los métodos de diferenciación de cepas, procedentes de campo, por el uso de diferentes técnicas de genotipificación (Olvera y col, 2006a). Tal es el caso de la amplia diversidad de resultados encontrados, cuando se emplearon como herramientas de diagnóstico, la técnica de serotipificación, la técnica de aplicación de huellas genómicas con endonucleasas de restricción (Smart y col, 1998) y el empleo de la técnica de electroforesis con enzimas de multilocus (MEE) (Blackall y col, 1997). Por

este motivo, actualmente se emplean las técnicas de PCR de elementos repetitivos como la (REP-PCR) empleada por Versalovic y col, (1991) y Woods y col, (1993), para la caracterización de diversos aislamientos de *H. parasuis*.

La técnica de aplicación de huellas genómicas con endonucleasas de restricción y la técnica de electroforesis con enzimas de multilocus (MEE), han sido usadas exitosamente para caracterizar y comparar cepas del microorganismo procedentes de varias piaras y de varios sitios del cuerpo de porcinos sanos y enfermos (Blackall y col, 1997). La caracterización por MEE de cepas de *H. parasuis* obtenidas del tracto respiratorio o sitios sistémicos, revelan una alta diversidad entre los aislamientos de este agente, incluyéndose cepas del mismo serotipo (Oliveira y col, 2003).

Por otro lado, la falta de asociación entre el genotipo y el serotipo se atribuye a varios factores. Se estima que inicialmente se debe a una identificación incorrecta del grupo del serotipo cuando se emplea el test de precipitación en gel de agar (AGPT), o por múltiples reacciones cruzadas cuando se emplea el test de coagulación (CA), adicionalmente algunas cepas pueden no producir suficientes antígenos para ser detectados por serotipificación ó porque debido a pases seriados *in vitro* de la cepa, se selecciona un clon de *H. parasuis* sin capsula. Sin embargo, Del Rio y col, (2003), determinaron que por el test de hemaglutinación indirecta (IHA), se obtienen más reacciones específicas, ya que es capaz de asignarle un serotipo a un 90% de los aislamientos, en comparación con el test de AGPT, que solo asigno un 63%.

Otro hecho que confirma la utilidad y la práctica de la genotipificación por ERIC-PCR, en comparación con la técnica de serotipificación, es el alto número de cepas no tipificables (Rafiee y col, 2000a). El alto porcentaje de cepas no tipificables (15 a 26%) en diferentes investigaciones (Kielstein y col, 1992; Rapp-Gabrielson y col, 1992 y Blackall y col, 1996), se acepta como un indicador de la existencia de más serovares, con respecto a los 15 actualmente reconocidos. Mientras, que por la técnica de ERIC-PCR se obvia el problema de obtener cepas no tipificables, debido a

que todas las cepas son agrupables por este método.

De otro lado, estudios previos, sugieren que hay una necesidad a nivel general de emplear la técnica de genotipificación en microbiología, con el fin de caracterizar las cepas sin ambigüedades en un organismo (Versalovic y col, 1994; Raffiee y col, 2000; Oliveira y col, 2003 y Olvera y col, 2006a, c). La identificación de las cepas bacterianas tiene diferentes aplicaciones, como es la determinación de cuantas cepas están implicadas en un solo brote (epidemiología local) o la relación de cepa particulares con otras aisladas en diferentes áreas geográficas o en diferentes espacios de tiempo (epidemiología global).

La epidemiología local, sirve para determinar si una cepa o varias cepas de *H. parasuis*, pueden producir un brote o en el caso de una infección persistente, sirve para evaluar si el tratamiento fallo o si una nueva cepa virulenta ha sido introducida. Mientras, que la epidemiología global estudia las relaciones entre diferentes líneas de clones al interior de una piara y entre piaras, su distribución a nivel global y los determinantes que causan estas distribuciones. Por lo tanto, la fortaleza y la debilidad de una prueba de genotipificación depende de su relativo poder de discriminación, la reproducibilidad del ensayo, el tiempo y el costo de la técnica (Foxman y col, 2005, En: Olvera y col, 2006b, c).

1.7.2.1. Técnica de PCR para la amplificación de secuencias intergénicas del consenso repetitivo de las *Enterobacterias* (ERIC-PCR).

Las secuencias repetitivas de elementos de ADN entremezclado se ha caracterizado extensivamente en eucariotas, pero en procariotas no se han realizado muchos estudios al respecto. El genoma de los microorganismos procariotas es más pequeño que el genoma de los mamíferos con una diferencia aproximada de 10^6 contra 10^9 pares de bases de ADN, respectivamente (Versalovic y col. 1991).

Este pequeño genoma procariótico, se debe haber mantenido a través de los años por

la presión de la selección natural, para que la replicación de su ADN y la reproducción de sus células, ocurriera rápidamente. Mientras que las secuencias de ADN repetitivo que no está codificado probablemente podrían estar reservadas al mínimo, bajo la presión de la selección natural, para que este crezca rápidamente, a no ser que las secuencias se conserven a ellas mismas como ADN “egoísta” (Versalovic y col. 1991).

Versalovic y col. (1991), investigaron las secuencias de ADN repetitivo en eubacterias, por medio del análisis de elementos repetitivos palindrómicos extragénicos [REP], de manera diferente conocido como unidad palindrómica [PU] y las secuencias intergénicas de consenso repetitivo de Enterobacterias [ERIC]. En cuanto a los elementos de la REP se describieron como secuencias potencialmente reguladoras dentro de regiones no traducidas de operones en virtud de su naturaleza palindrómica y a su habilidad para formar estructuras estables de doble giro en el ARN transcrito. Múltiples funciones se han propuesto para esta región altamente conservada de elementos dispersos de REP, incluyendo roles en la terminación de la transcripción, la estabilidad en el ARNm y la organización *in vivo* de los dominios cromosomales (Stackerbrandts E, 2006).

Recientemente una nueva familia de elementos repetitivos [ERIC], conocida como unidades repetitivas intergénicas [IRUs], se definió usando información de las secuencias genómicas de *E. coli* y *S. typhimurim* (Sharples y col, 1990; En Versalovic J, 1991). Las secuencias de ERIC son un palíndrome imperfecto de una longitud de 126 bp. Son restrictivas de las regiones transcritas del genoma, tanto en regiones intergénicas de los operones policistronicos, como en regiones no transcritas corriente arriba o corriente abajo del marco abierto de lectura (ORF). Las secuencias de ERIC son altamente conservadas a nivel de las secuencias de los nucleótidos y están localizadas en las regiones extragénicas no codificantes del genoma, pero su ubicación cromosomal difiere entre especies. Varios reportes indican, que las secuencias de ERIC son semejantes a las secuencias de REP (Stern y col, 1984; En:

Hulton y col, 1991), sin embargo, las secuencias de nucleótidos son completamente diferentes (Sharples y col, 1990; Hulton, y col, 1991; En: Versalovic J, 1991).

Las regiones REP son secuencias no codificadas que se localizan entre genes activos y en la ERIC-PCR, se busca como resultado la amplificación de las secuencias localizadas entre las secuencias repetitivas. La mayoría de los eventos de recombinación que ocurren en el genoma bacteriano involucran la participación de secuencias repetitivas dado que se trata de regiones inestables en el ADN (Shyamala y col, 1990).

A pesar de ello las secuencias del consenso ERIC no parecen tener relación alguna con las secuencias del consenso REP (Hulton, y col, 1991). Por otro lado, Versalovic y col, (1991,1994) describieron la distribución de los elementos repetitivos en Eubacterias y resaltaron su aplicación, para la tipificación del genoma bacteriano, a través del desarrollo de iniciadores con oligonucleótidos, diseñados especialmente, para cada mitad de la región conservada del palíndromo (Stackerbrandts E, 2006).

La técnica de Finger Printing ó Técnica de Huella Genética (técnica capaz de diferenciar entre individuos de la misma especie, usando sólo muestras de su ADN), fue ingenjada en 1985 por Alec Jeffreys. Esta técnica se fundamenta, en un método de identificación universal con base en las características singulares del genoma en estudio.

Desde entonces se ha seguido estudiando las secuencias Rep-PCR. Los elementos de palíndromos repetitivos tales como, la (REP) y la (ERIC), se han empleado para obtener patrones de huellas genómicas a partir de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Tal es el caso del uso de la ERIC-PCR, la cual fue por primera vez descrita para la caracterización de aislamientos en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, (actualmente *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*), y otros miembros de las Enterobacterias (Higging y col, 1982; Sharples y Lloyd 1990 y Hulton y col, 1991; En: Lindsay y col, 2006). También se realizaron estudios en *Yersinia*

pseudotuberculosis, *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio cholera* (Hulton y col, 1991; Kingston J y col, 2009), *Mycoplasma sp*, *Salmonella sp* (Burr y col, 1996; Saxena y col, 2002), *Streptococcus pyogenes* (Matsumoto y col, 2001), especies de *Bartonella sp* (Rodríguez M y col, 1995), *Bartonella bacilliformis* (Padilla y col, 2003), y *Serratia marcescens* (Kyeong S, 2003), entre otras.

La ERI-PCR, también se ha aplicado exitosamente en estudios de distribución y caracterización genotípica de *Staphylococcus epidermidis* (Wiser y col, 2000), especies de *Bifidobacterium* (Ventura y col, 2002, 20003), *Listeria monocytogenes* (Harvey y col, 2004), en *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Rissen y *Salmonella Weltevreden* en alimentos de mar en la India (Kumar R y col, 2009) y en micología se evaluó varios tipos de cepas del genero *Penicilium* (Redondo C y col, 2009).

En suelos se estudio las secuencias de elementos de ERIC, obtenidos de *Rhizobium meliloti*, los cuales aportaron información valiosa en cuanto al diseño de prueba de los oligonucleótidos, usados en la identificación rápida de colonias de *R. meliloti* (De Bruijn F, 1992; Niemann y col, 1999, En: Stackerbrandts E, 2006), Por otro lado, en Italia se empleó esta técnica para tipificar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Shechy y col, 1998).

La estabilidad en los perfiles de ERIC, generados a partir de cinco especies bacterianas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*), luego de 24, 48 y 72 horas de incubación, fue analizado por Kang y Dunne (2003). Adicionalmente estas mismas especies fueron subcultivadas diariamente, hasta alcanzar 15 divisiones generacionales. Los análisis por ERIC-PCR, realizados a ambos experimentos, demostraron que la PCR de huellas genéticas obtenida de una sola especie fue idéntica. No obstante, Reboli y col, (1994), reportaron que la ERIC no era capaz de distinguir entre diferente especies, mientras que por REP-PCR, determinaron las relaciones interespecíficas de este organismo

(Stackerbrandts, 2006).

El poder de discriminación puede llegar a ser incrementado significativamente al combinar la tipificación por BOX, ERIC y REP en un mismo estudio. Estas técnicas han sido exitosamente aplicadas, para resolver la diversidad de fluorescencia de la especie *Pseudomonas* (Dawson y col, 2002), mientras que con la combinación de BOX y REP-PCR, se logro avanzar en la diferenciación del serotipo de *E. coli* 0157 de las otras especies de *E. coli* (Hahm y col, 2003 y Rademaker y col, 2000, En: Stackerbrandts E, 2006).

Una de las pocas secuencias conocidas de *H. parasuis* es la del gen 16S rRNA. Esta secuencia genómica es apropiada para la identificación y definición de especies (Olvera y col, 2006b, c). Esta se ha usado exitosamente en la clasificación de especies de la familia *Pasteurellaceae*, permitiendo la diferenciación de *H. parasuis* de otras bacterias NAD-dependientes, aisladas comúnmente del porcino como: *Actinobacillus minor*, *Actinobacillus porcinus* y *Actinobacillus indolicus*. Sin embargo, la secuencia del gen 16S rRNA usualmente no es adecuada para realizar diferenciación entre cepas, debido a la escasa variabilidad por debajo de la jerarquía del nivel de especie (Olvera y col, 2006b).

Todos los métodos descritos para tipificar requieren de un cultivo aislado de *H. parasuis* y este proceso es complejo debido a las características de cultivo fastidiosas propias del microorganismo. Por este motivo Oliveira y col (2002), desarrollaron un nuevo método de tipificación de *H. parasuis*, basado en la PCR, a partir de elementos repetitivos (ERIC-PCR), el cual no requirió un aislamiento previo del organismo, para caracterizar la diversidad de los aislamientos y epidemiología de las infecciones de *H. parasuis* en y entre las piaras con la finalidad de caracterizar la variabilidad genética en cepas de campo y entre serovares.

Por otro lado, Rovira y Pijoan, (2004), establecieron que dentro de una piara, la identificación de las cepas prevalentes y el genotipo de los organismos aislados por

ERIC PCR (Amplificación de Secuencias Intergénicas del Consenso Repetitivo de Enterobacterias) debe de ser comparado entre sí y para ello se estima que se deben emplear aproximadamente diez aislamientos de la bacteria.

Varias empresas de producción porcina y médicos veterinarios de Estados Unidos están utilizando actualmente esta técnica. En estos casos, el diagnóstico, el aislamiento de *H. parasuis* y la preparación del inóculo se realiza en un pequeño laboratorio bacteriológico dentro de la clínica o empresa, mientras que la identificación de la cepa prevalente (ERIC PCR) se realiza en un laboratorio de investigación. Una vez puesta en práctica la técnica de exposición controlada dentro de la explotación, es importante instaurar un plan de vigilancia para detectar rápidamente la posible aparición de nuevas cepas en la granja de forma que se puedan incluir en el inóculo (Rovira y Pijoan, 2004).

Smart y col, (1988), fueron los primeros en genotipificar por la técnica de ERIC-PCR, cepas aisladas de *H. parasuis* de diferentes piaras y 11 cepas de referencia, empleando enzimas de restricción. Los resultados indicaron que esta técnica es capaz de diferenciar con precisión las cepas de referencia, debido a que es una técnica altamente discriminativa.

La técnica de PCR a partir de elementos repetitivos (REP-PCR), ha sido usada exitosamente para caracterizar y comparar aislamientos de *H. parasuis* (Raffie y col, 2000 y Oliveira y col, 2004a). Igualmente. Ruiz y col (2001), compararon los perfiles genotípicos empleando la técnica de ERIC-PCR a partir de 53 cepas recuperadas de varios sitios de muestreo en los cerdos y encontraron evidencia de una relación clonal entre aislamientos de *H. parasuis* que originaron enfermedades sistémicas. Teniendo como base los estudios anteriormente citados, se puede considerar que la técnica de genotipificación aplicada en este estudio, es gran utilidad para discernir entre las cepas de diferente procedencia y para poder establecer relaciones epidemiológicas entre las piaras.

Se ha aplicado también, un método similar para estudiar los perfiles de las proteínas de membrana externa (OMP), a partir de preparaciones de suspensiones de bacterias rotas por ultrasonidos. Mediante este procedimiento, se han llegado a diferenciar hasta 18 patrones diferentes, que ratifican la gran variabilidad intraespecífica, ya comentada.

Recientemente la PCR con fragmentos de restricción (PCR-RFLP) [*Restriction Fragment Length Polymorphism*], se usó para realizar un análisis, usando las secuencias de *tbpA* y *aroA*, pero la aplicación de esta técnica no proporcionó suficiente información acerca de la filogenia existente entre cepas (Del Rio y col, 2006a). Otra aproximación para lograr la diferenciación entre cepas de campo es por el uso de una PCR en las regiones intergénicas del consenso repetitivo de las Enterobacterias (ERIC-PCR). Para cepas de *H. parasuis*, una diferenciación de huellas genéticas por ERIC-PCR es altamente heterogénea y aun cuando este método es muy usado en estudios epidemiológicos locales, en particular no tiene aplicación práctica, para estudios globales al momento de evaluar la diferenciación entre cepas circulantes en una granja (Oliveira y col, 2003; Olvera y col, 2006b). Además los resultados obtenidos de diferentes laboratorios usando la ERIC-PCR y la PCR-RFLP, son difíciles de comparar (Olvera y col, 2006a).

Actualmente, la detección del *H parasuis* mediante procedimientos moleculares tiene gran futuro. Por ello Rodríguez Ferri y col, (2000), idearon y desarrollaron una derivación de la PCR, con iniciadores diseñados sobre zonas de homología, conservadas, de las secuencias de los genes *tbpB* y *tbpA*. Estos iniciadores, no solo son capaces de detectar la presencia de *H. parasuis* entre colonias sospechosas en cultivo, sino incluso directamente de material patológico obtenido del cadáver o hisopos de secreción nasal.

El procedimiento discrimina, en función del tamaño de bandas detectada, la presencia

de *A. pleuropneumoniae* y *A. suis*. Otros microorganismos porcinos no patógenos del mismo género o próximos (*A. indolicus*, *A. porcinus*, *A. minor*, *Haemophilus taxón C*), de la misma familia (*P. multocida*) o de otras, resultan claramente diferenciados. El procedimiento puede completarse mediante un análisis por restricción con endonucleasas (PCR-RFLP), utilizando por ejemplo *AvaI*, *TaqI* y *RsaI*, que permiten diferenciar entre diferentes tipos genéticos.

1.7.2.2. Análisis de los patrones electroforéticos: ERIC-PCR

Para obtener información acerca de la relación existente entre los diferentes aislamientos encontrados en los datos de huellas genómicas, usualmente se construye un dendograma. Con este propósito, varios algoritmos especializados se han desarrollado y varios software (programas informáticos) se encuentran disponibles en el mercado (Applied Maths, BioNumerics, BioRad, Biosystematics, Media Cybernetics, Scanalytics). Antes de este análisis, se requiere de la creación de una foto digital, con la finalidad de detectar las bandas y comparar los diferentes perfiles. Una matriz de distancia de Pearson puede ser construida con base en la presencia de bandas (o ausencia) entre cada par de huellas genómicas. Muchos algoritmos han sido propuestos para la estimación de este cálculo y pueden basarse en la presencia de una banda o su intensidad (Van Ooyen, 2001; Olvera, 2006c).

Frecuentemente, se recomienda el uso de la correlación de Pearson para la construcción de la matriz y de la agrupación por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), para la construcción del dendograma (Van Ooyen, 2001; Olvera, 2006c). Sin embargo, en este último no se puede detectar el cero entre bandas y por ello probablemente sea mejor el uso de NJ (Neighbor-joining), (Hall & Barlow, 2006; En: Olvera, 2006c). Casi todos los softwares incluyen módulos de normalización para optimizar la comparación entre diferentes geles. Sin embargo, la variabilidad que existe entre geles, hace dicha comparación difícil y poco óptima. Para disminuir estas limitaciones se han propuesto los métodos de secuenciación, debido a que los cromatogramas son fáciles de comparar e intercambiar (Olvera,

2006c).

1.8. OTROS MÉTODOS DE DIAGNOSTICO.

1.8.1. Método de diagnostico serológico.

La detección de anticuerpos en el suero de los animales enfermos no posee demasiado sentido. Por un lado, no permite diferenciar el serotipo implicado en la infección y por otro, el porcentaje previsto de animales portadores de los mismos ha de ser, necesariamente muy alto y su significación muy escasa, dado el carácter de comensal habitual en las fosas nasales de animales sanos. A esto se le suman, la detección de anticuerpos en el suero de los animales enfermos no posee demasiado sentido. Por un lado, no permite diferenciar el serotipo implicado en la infección y por otro, el porcentaje previsto de animales portadores de los mismos ha de ser, necesariamente muy alto y su significación muy escasa, dado el carácter de comensal habitual en las fosas nasales de animales sanos.

A esto se le suman, además, que en muchas explotaciones de porcinos circulan, sin demasiadas consecuencias, cepas de *H. parasuis* de virulencia baja o nula, pero que sí inducen respuesta humoral detectable y que, por otra parte, algunas cepas de *H. parasuis* solo son débilmente inmunogénicas, lo que traduce dificultades para la detección de la respuesta e incluso tampoco permite disponer de reactivos de calidad para ello. Las razones anteriores hacen que, una serología positiva sea absolutamente compatible con un animal sano, hecho que es considerado conveniente desde el punto de vista del control, puesto que supone una cierta experiencia inmunológica que previene de procesos agudos que pueden causar desastres económicos en la explotación. Sumado a los inconvenientes anteriores, hay que unir la falta de especificidad que se traduce no solo en las reacciones cruzadas entre serotipos, ya comentadas, sino también con otras especies, como es el caso de *A. pleuropneumoniae* y de otras especies de la familia. En la práctica, se han utilizado diversas opciones serológicas de diagnóstico, como la reacción de fijación del

complemento, la ELISA o la Inmunofluorescencia (Rodríguez. y col, 2000).

La ELISA indirecta es, en la actualidad, el procedimiento más utilizado, con un antígeno obtenido a partir de un serotipo virulento, con niveles aceptables de sensibilidad y especificidad, aunque también se presentan reacciones cruzadas entre serotipos.

En algunos lugares se practica un *Método de Fijación del Complemento* para la tipificación, pero plantea el grave inconveniente de numerosas reacciones cruzadas entre serotipos, lo que unido a la posibilidad de que en la misma explotación y aún en el mismo animal circulen distintos serotipos, representa un procedimiento muy complicado de usar y extraer conclusiones prácticas útiles (Rodríguez. y col, 2000).

1.8.2. Método de diagnóstico inmunohistoquímico.

La detección directa del antígeno puede ser evaluada mediante *métodos inmunohistoquímicos*, por ejemplo un sistema de avidina-biotina, como se ha demostrado en el caso del serotipo 5, en condiciones experimentales, aunque los resultados dependerán estrictamente de la calidad de los anticuerpos utilizados (policlonales o monoclonales). Tienen la ventaja de que pueden aplicarse a tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, pero no resuelve reacciones falsamente positivas con *A. pleuropneumoniae* (Rodríguez. y col, 2000).

1.9. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DIFERENCIAL

1.9.1. Forma Aguda.

En el siguiente cuadro se presentan los diferentes signos clínicos agudos que se presentan en los porcinos y los diferentes microorganismos con los que se realiza un diagnóstico clínico diferencial frente a *H. parasuis*.

Artritis y Cojeras	
Infección <i>Streptococcus suis</i> I y II	- También puede causar endocarditis.
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	- Mortalidad y morbilidad son <10%.
Poliserositis	
Infección <i>Streptococcus suis</i> I y II	- Hay poco depósito de fibrina sobre el peritoneo. - También causa endocarditis.
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	- Mortalidad y morbilidad son <10%.
Pleuritis / Pericarditis	
Infección <i>Streptococcus suis</i> I y II.	- Hay poco depósito de fibrina sobre el peritoneo. - También suele causar endocarditis.
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	- Mortalidad y morbilidad son <10%
<i>Actinobacillus suis</i>	- Sólo en lechones lactantes o recién destetados. - Mortalidad alta y morbilidad baja. - Endocarditis.
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	- Neumonía aguda y necrótica. - Porcino de 8-16 semanas de edad. - Sin lesiones en otros aparatos.
<i>Pasteurella multocida</i>	- Sin lesiones en otros aparatos.
Enfermedad del corazón de mora (déficit de vitamina E).	- Áreas pálidas de necrosis en hígado y músculos.

- Hidropericardio.

Disnea y tos	
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	- Porcino de 8-16 semanas de edad sin lesiones en otros aparatos.
<i>Pasteurella multocida</i>	- Neumonía, sin lesiones en otros aparatos.
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	- Sin afectación pleural. - Sin lesiones en otros aparatos.
<i>Actinobacillus suis</i>	- Sólo en lechones lactantes o recién destetados. - Mortalidad alta y morbilidad baja
Para determinar la importancia real de <i>Haemophilus parasuis</i> en las bronconeumonías, es necesaria la identificación y el control de otros agentes patógenos con los que suele ir asociado.	
Síntomas Nerviosos	
Infección <i>Streptococcus suis</i> I (maternidad)	- También puede causar endocarditis. - Morbilidad elevada.
Infección <i>Streptococcus suis</i> II (crecimiento-engorde).	- También puede causar endocarditis. - Baja morbilidad con Mortalidad alta.
Enfermedad de los Edemas (<i>E. coli</i>).	- Edemas en estómago, colon y párpados. - Ausencia de fiebre. - Ausencia de meningitis supurativa.
En la práctica, hay que diferenciar la enfermedad de Glässer de la infección por <i>Streptococcus suis</i> ya que estos dos agentes producen meningitis fibrinosas o fibrinopurulentas que pueden ir acompañadas por un cuadro de poliartritis y poliserositis.	

En cuadros septicémicos debe diferenciarse de otras bacterias más típicamente septicémicas como la *Salmonella cholerasuis*, *Streptococcus suis* y *Actinobacillus*

suis.

1.9.2. Forma Crónica.

En el siguiente cuadro se presentan los diferentes signos clínicos crónicos que se presentan en los porcinos y los diferentes microorganismos con los que se realiza un diagnóstico clínico diferencial frente a *H. parasuis*.

Artritis y Cojeras	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> .	<ul style="list-style-type: none"> - Lesiones cutáneas características - Asociada a endocarditis valvular - El inicio suele ser repentino
Artritis por <i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Animales de 8 a 30 semanas de edad - El inicio suele ser repentino - La temperatura puede ser normal
Disnea y tos	
<i>Pasteurella multocida</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Sin lesiones en otros aparatos
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Sin afectación pleural. - Sin lesiones en otros aparatos

1.10. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD.

Los programas de prevención y control pueden estar basados en el uso de vacunas y antibióticos, no obstante es importante practicar normas de manejo orientadas a reducir o eliminar otros agentes patógenos respiratorios, controlar el flujo de animales y evitar la mezcla de animales en todas las fases de producción (Rodríguez y col, 2000). La primera medida de prevención es la práctica de un manejo sanitario correcto.

Las recomendaciones en este apartado son las siguientes:

- 1) Realizar un adecuado programa de adaptación sanitario en cerdas primerizas que posibilite el contagio paulatino en un adecuado local de adaptación sanitario.
- 2) Lavar las cerdas antes de entrar en la sala de parto.
- 3) Controlar que cada lechón reciba la máxima cantidad de calostro al nacer (los anticuerpos son posiblemente el principal mecanismo de inmunidad protectora).
- 4) Proporcionar una buena higiene y manejo dentro de la sala de parto.
- 5) Practicar siempre el sistema todo dentro/ todo fuera estricto en maternidad, destete y engorde.
- 6) Utilizar rejillas de plástico en destete.
- 7) Controlar de forma intensa las temperaturas ambiente (temperaturas confort) durante los primeros 3 días posparto, 5 días pos-destete y 10 días después de la entrada en engorde.
- 8) Mantener a los porcinos por encima de la temperatura crítica inferior. Utilizar un adecuado aislamiento en las paredes de las naves.
- 9) Suministrar un mínimo de $0,22 \text{ m}^2$ / lechón en el destete y $0,75 \text{ m}^2$ /cerdo de engorde.
- 10) En engordes con ventilación natural disponer un mínimo de $3,3 \text{ m}^3$ /cerdo.
- 11) Suministrar un caudal constante de agua durante el destete de 750 ml/min . En cazoleta (una cazoleta cada 10 - 15 lechones).
- 12) Comprobar si el peso de los animales a la entrada en un local es adecuado para soportar el ambiente, el tipo de alojamiento y el tipo de suelos.
- 13) Evitar las corrientes de aire.
- 14) Evitar ambientes con bajas temperaturas y humedad.
- 15) Mantener el ambiente con una temperatura elevada y baja humedad o viceversa.
- 16) Evitar la mezcla de animales de diferentes orígenes sanitarios en la fase de engorde.

Según reportaron Madsen y col, (1984), Wiseman y col, (1992) y Menard y Moore, (1990) En: Rapp-Gabrielson, (1999), el uso profiláctico de antibióticos o medicamentos terapéuticos de uso oral, pueden llegar a ser de poco valor en casos severos o brotes ocasionados por *H. parasuis*. Mientras que Desrosiers y col (1986), sugieren que se debe tratar y administrar con altas dosis de antibióticos por vía parenteral, tan pronto se manifiesten los primeros signos clínicos, a todos los porcinos de una piara afectada y no solo a aquellos que muestren signos de enfermedad, (Rapp-Gabrielson, 1999).

En los casos en los que los lechones lactantes se vean afectados, se puede prevenir la enfermedad: Inyectando las cerdas con penicilina o amoxicilina o ampicilina en el momento del parto o bien medicando la piara (7 días antes del parto y 7 días después) con fenoximetil penicilina o amoxicilina o ampicilina.

En los casos de expresión de enfermedad en lechones destetados y/o engorde: **1)** Mediar raciones de lactación, iniciador de destete y/o entrada de engordes con 200 - 250 gramos / ton de fenoximetil penicilina o amoxicilina o ampicilina (300 gramos / ton), **2)** Inyectar todos los lechones dos días antes de la incidencia y el día de mayor incidencia de la enfermedad con Penicilina retardada, **3)** Realizar medicaciones pulsátiles (tres días a la semana) dos semanas antes y después del período de mayor incidencia con Amoxicilina en el agua de bebida.

En todos los casos de medicación con antibióticos se debe prestar especial atención al período de retirada de los mismos para evitar residuos en carne (especialmente en las cerdas y en porcino de sacrificio). Se debe tratar a *H. parasuis* como un germen ubicuo, el cual se encuentra distribuido por todo el mundo y está presente incluso en las granjas de alto estado sanitario, por este motivo es realmente difícil conseguir la erradicación de la enfermedad en cerdas portadoras, debido a que la eliminación del

patógeno, empleando un destete precoz es prácticamente imposible, dado que la contaminación de las mucosas de los lechones recién nacidos se produce incluso antes de la primera semana de vida.

La practica de la despoblación - repoblación puede contemplarse siempre que los lechones producidos después de la repoblación no se mezclen con animales portadores ya que en el caso de tener contacto con animales "contaminados" en alguna de las fases productivas los efectos pueden ser devastadores.

1.10.1. Inmunidad y vacunas.

La vacunación es un procedimiento eficaz para la prevención de la enfermedad de Glässer. En la práctica, se utilizan vacunas inactivadas (bacterianas) o autovacunas con diferente éxito, que adolecen del inconveniente de la falta de protección heteróloga (sin embargo, algunas veces se ha descrito), limitándose a la protección frente al serotipo homólogo correspondiente. Según parece, las OMP's son más inmunogénicas que los LPS o que los antígenos capsulares.

La mayoría de los preparados disponibles comercialmente en la actualidad incluyen el serotipo 4 o el serotipo 5, inactivando con formol (0'25%) y ajustando la dosis, por serotipo, en torno a 1×10^9 UFC/ml. En el Japón, debido al incremento de importancia del serotipo 2, se han utilizado, con éxito, formulaciones que incorporan los serotipos 2 y 5. Es habitual el uso de adyuvantes, bien de tipo oleoso, o de hidróxido de aluminio, dependiendo de las preferencias y según la edad de los animales a proteger. En la práctica, se suelen administrar 2 dosis, en un intervalo de 2-4 semanas. Se trate de vacunas mono o bivalentes, la protección que confiere el producto es adecuada, protege de la mortalidad y no se descubre la presencia de lesiones graves. Los títulos consiguen su punto más alto alrededor de 20 días después de la segunda vacunación (en torno a 5 unidades logarítmicas como media, por fijación del complemento) y a partir de entonces disminuyen progresivamente

(alrededor de los dos meses mantienen títulos de 3 unidades logarítmicas, aproximadamente).

Es habitual que cada dosis, de alrededor de 5 ml, sea dividida en dos mitades, que se administran subcutáneamente en las tablas del cuello, en las proximidades de las orejas. En la mayor parte de los casos se vacunan los lechones o los animales de reemplazo y se recomienda la revacunación antes del contacto previsto con el agente.

La inmunidad maternal ha sido estudiada por algunos autores con el fin de comprobar su efecto protector en lechones. En un experimento en el que se vacunaron a madres con dos dosis de una bacterina comercial que incluía los serotipos 4 y 5, antes del parto, los lechones estuvieron protegidos frente al desafío con las cepas homólogas, no observándose en estos, respecto de los controles, ni lesiones sistémicas ni poliserositis. Por otra parte, según los autores, los anticuerpos maternos no interfirieron con la vacunación de los lechones en la primera y tercera semanas de edad. Al momento de presentarse brotes por la enfermedad de Glässer's, causada por *H. parasuis*; la primera estrategia de minimización de daños, es disminuir la severidad de la enfermedad, prevenir la prolongación de la infección y prevenir la recurrencia de la enfermedad.

En casos tempranos, se pueden utilizar con éxito el tratamiento parenteral con penicilina, amoxicilina, ampicilina, oxitetraciclina, enrofloxacin y sulfamidas - trimetoprim. El tratamiento debe de realizarse de forma temprana, especialmente en los casos de meningitis. Es básico identificar el comienzo de la enfermedad.

La Penicilina ha sido considerada la droga por excelencia, pero igualmente se ha reportado un incremento significativo en su resistencia (Kielstein y Leiver, 1990). Igualmente, se ha reportado que la gran mayoría de cepas de *H. parasuis* son sensibles in Vitro a la ampicilina, fluoroquinolonas, cefalosporinas, gentamicina, estreptomina y a algunas sulfas; un alto numero de cepas son resistentes a la tetraciclina, eritromicina y otros aminoglicosidos y lincosamidas (Kielstein 1985., Trigo y col, 1996. En: Rapp-Gabrielson, 1999).

La medicación con agua de bebida durante tres días con Amoxicilina (250 gramos/1000 litros) seguida de una medicación durante una semana con fenoximetil penicilina en la ración (250 gramos / ton) da buenos resultados en casos graves.

1.11. PRUEBAS DIAGNOSTICAS.

Las pruebas diagnosticas son el instrumento que se utiliza para diferenciar de la forma más exacta y fiable posible a los individuos enfermos de los no enfermos.

Es evidente que una buena prueba diagnostica es la que ofrece resultados positivos en los realmente enfermos y negativos en los sanos (Morrison, 1992). Por lo tanto, las condiciones que deben ser exigidas en una prueba son:

- **Validez:** Es el grado en que una prueba mide lo que se supone que debe medir. ¿Con que frecuencia el resultado de la prueba es confirmado por procedimientos diagnósticos más complejos y rigurosos? La sensibilidad y especificidad de una prueba son medidas de su validez.
- **Reproducibilidad:** Es la capacidad de la prueba para ofrecer los mismos resultados cuando se repite su aplicación en circunstancias similares. La variabilidad biológica del hecho observado, la introducida por el propio observador y la derivada de la propia, determinan su reproductividad.
- **Seguridad:** La seguridad viene determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo. ¿Con que seguridad una prueba predecirá la presencia o ausencia de la enfermedad? Ante un resultado positivo de una prueba ¿Qué probabilidad existe de que este resultado indique presencia de la enfermedad?

A su vez, es conveniente que la prueba sea sencilla de aplicar, que tenga los mínimos efectos adversos y que económicamente sea soportable.

1.11.1. Validez de una prueba diagnóstica: Sensibilidad y Especificidad.

El caso más sencillo que se puede plantear es el de una prueba dicotómica, que clasifica a cada paciente como sano o enfermo en función de que el resultado de la prueba sea positivo o negativo. En casos como éste, generalmente un resultado positivo se asocia con la presencia de la enfermedad y un resultado negativo con la ausencia de la misma. Cuando se estudiada una muestra de pacientes, los datos obtenidos permiten clasificar a los sujetos en cuatro grupos según una Tabla de 2 x 2 como la que se muestra en la Tabla 6. En ella, se enfrenta el resultado de la prueba diagnóstica (en filas) con el estado real de los pacientes (columnas) o, en su defecto, el resultado de la prueba de referencia o “gold estándar” que vayamos a utilizar. El resultado de la prueba puede ser correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo). El análisis de su validez puede obtenerse calculando los valores de sensibilidad y especificidad (Altman y Bland, 1994a).

Tabla 6. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad. Fuente: Altman y Bland, (1994a).

Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico	
	Enfermo	Sano
Positivo	Verdaderos Positivos (VP) Tienen la enfermedad y resultaron positivos	Falsos Positivos (FP) No tienen la enfermedad pero resultaron positivos
Negativo	Falsos Negativos (FN) Tienen la enfermedad pero resultaron negativos	Verdaderos Negativo (VN) No tienen la enfermedad y son negativos

1.11.1.1.Sensibilidad.

Es la capacidad de una prueba para identificar correctamente los animales enfermos cuando la prueba es positiva. Es decir, la probabilidad de que en una muestra este presente *H. parasuis* y se obtenga en la prueba diagnostica un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad producida por este microorganismo.

Cuando los datos obtenidos a partir de una muestra, se clasifican en una tabla como la que se muestra en la Tabla 6, es fácil estimar a partir de ella la sensibilidad como la proporción de animales enfermos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnostica. Es decir:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

1.11.1.2. Especificidad.

Es la capacidad de una prueba para identificar correctamente a aquellos animales sanos, cuando la prueba es negativa. Es decir, la probabilidad de que una muestra no se encuentre *H. parasuis* y se obtenga en la prueba diagnostica un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los animales sanos. A partir de una tabla como la Tabla 6, la especificidad se estimaría como:

$$\textit{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

De ahí que también sea denominada “fracción de verdaderos negativos (FVN)”.

Resulta obvio que lo ideal sería trabajar con pruebas diagnósticas de alta sensibilidad y especificidad, pero esto no siempre es posible. En general, las pruebas de screening deben ser de alta sensibilidad para poder captar a todos los enfermos. Una prueba muy sensible será especialmente adecuada en aquellos casos en los que el no diagnosticar la enfermedad puede resultar fatal para los enfermos, como ocurre con enfermedades peligrosas pero tratables, o en enfermedades en las que un falso positivo no produzca serios trastornos.

Por otra parte, la especificidad se refiere, como se señaló previamente, a la probabilidad de que un sujeto sano sea clasificado adecuadamente. En general, las pruebas confirmatorias del diagnóstico deben ser de alta especificidad, para evitar falsos positivos. Las pruebas de alta especificidad son necesarias en enfermedades graves pero sin tratamiento disponible que las haga curables, cuando exista gran interés por conocer la ausencia de enfermedad o cuando diagnosticar a un paciente de un mal que realmente no padece pueda acarrear graves consecuencias, ya sean físicas o económicas.

1.11.2. Seguridad de una prueba diagnóstica: Valores predictivos.

Los conceptos de sensibilidad y especificidad permiten, por lo tanto, valorar la validez de una prueba diagnóstica. Sin embargo, carecen de utilidad en la práctica clínica. Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo) en función

de la verdadera condición del enfermo con respecto a la enfermedad (Altman and Bland, 1994b).

1.11.2.1. Valor predictivo positivo.

Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos:

$$VPP = \frac{VP}{VP * FP}$$

1.11.2.2. Valor predictivo negativo.

Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba:

$$VPN = \frac{VN}{FN + VN}$$

1.11.3. La influencia de la prevalencia.

Los valores de sensibilidad y especificidad, a pesar de definir completamente la validez de la prueba diagnóstica, presentan la desventaja de que no proporcionan información relevante a la hora de tomar una decisión clínica ante un determinado resultado de la prueba. Sin embargo, tienen la ventaja adicional de que son propiedades intrínsecas a la prueba diagnóstica y definen su validez independientemente de cuál sea la prevalencia de la enfermedad en la población a la cual se aplica (Argimon y Jiménez, 2000).

Por el contrario, el concepto de valores predictivos, a pesar de ser de enorme utilidad a la hora de tomar decisiones clínicas y transmitir a los pacientes información sobre su diagnóstico, presenta la limitación de que depende en gran medida de lo frecuente que sea la enfermedad a diagnosticar en la población objeto de estudio. Cuando la prevalencia de la enfermedad es baja, un resultado negativo permitirá descartar la enfermedad con mayor seguridad, siendo así el valor predictivo negativo mayor. Por el contrario, un resultado positivo no permitirá confirmar el diagnóstico, resultado en un bajo valor positivo (Argimon y Jiménez, 2000).

En definitiva, es sumamente importante el saber valorar la validez y seguridad de las diferentes pruebas diagnósticas con el fin de seleccionar la más adecuada en cada momento. La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos son los criterios tradicionalmente utilizados para valorar la capacidad predictiva de una prueba. Los estudios de evaluación de pruebas diagnósticas son el instrumento adecuado para obtener esta información. No obstante, no debemos olvidar que existen determinados aspectos en el diseño de este tipo de investigaciones que pueden afectar a la precisión y a la validez de las estimaciones realizadas. La población de estudio, la estrategia de muestreo, la selección del criterio de referencia y la forma de aplicación de las pruebas diagnósticas serán algunos de los elementos a cuidar para evitar la presencia de sesgos (Greenhalgh, 1997).

1.11.4. El Índice Kappa (K).

El índice Kappa determina hasta que punto la concordancia observada es superior a la que es esperable obtener por puro azar. El índice kappa se podría definir como:

Fórmula índice Kappa

(Fuente: Altman, 1991.)

$$K = \frac{\sum \pi_{ii} - \sum \pi_i \sum \pi_i}{1 - \sum \pi_i \pi_i}$$

Donde, los índices el sumatorio van desde $i = 1$ hasta $i = C$.

La máxima concordancia posible corresponde a $K = 1$. El valor de $K = 0$ se obtiene cuando la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar. Si la concordancia es mayor que la esperada simplemente a causa del azar, $K > 0$ depende de las distribuciones marginales (Altman, 1991).

A la hora de interpretar el valor de K , es útil disponer de una escala como la presentada en la Tabla 7, a pesar de su arbitrariedad (Landis y Koch, 1977).

Tabla 7. Valoración del Índice Kappa.

Valor de K	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 -1.00	Muy buena

Fuente: Landis y Koch, (1977).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MARCO GEOGRAFICO.

El trabajo se llevo a cabo en la ciudad de Bogotá D.C. la cual tiene una altura entre los 2600 y 2800 msnm y una temperatura promedio de 14°C.

Las muestras se procesaron en las instalaciones de los Laboratorios de Medicina Porcina y Biología molecular, dentro del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (LNDV-ICA) sede CEISA.

2.2. MUESTRAS EMPLEADAS.

Los animales seleccionados para el muestreo tenían diferente raza, sexo y edad pero presentaban signos clínicos y lesiones en la necropsia compatibles con la infección producida por el microorganismo *Haemophilus parasuis*, como inflamación en articulaciones, síntomas nerviosos y síntomas de tipo respiratorio como neumonía entre la tercera y novena semana de edad y a partir de animales que preferiblemente no recibieron tratamiento con antibióticos.

Para realizar la selección de las 445 muestras se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos (Tabla general 8):

1). Origen geográfico en Colombia. Se colectaron muestras de las regiones localizadas en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cesar, Cundinamarca, Meta, Quindío, Santander, Tolima y Valle del Cauca y respectivamente en 48 municipio.

Tabla 8. Relación de muestras colectadas en la investigación, según procedencia, tipo de muestra examinado y técnica de diagnóstico.

PROCEDENCIA				TIPO DE MUESTRA EVALUADA																		Tipo de Muestra Total	CULTIVO (+)	PCR (+)	PCR(+)/CULTIVO(+)							
Departamento	Municipio	Código Granja	Casos de Campo y Laboratorio	Pulmón	Hisopo pulmón	Meninges	Hisopo Encéfalo	Encéfalo	Ganglio	Hisopo Articular	Líquido articular	Sangre ventricular	Hisopo ventricular	Hisopo Bronquial	Hisopo abdominal	Líquido abdominal	Bazo	Hígado	Hisopo nasal	Hisopo LCR	LCR					Líquido Torácico	Hisopo Tórax	Tonsila	Pericardico	Líquido pericardico	Hisopo pericardico	Hisopo Pleural
ANTIOQUIA	Don Matías	01	C																		2		1			1			4	0	0	0
	La Ceja	02	C	2							1	1																	4	1	1	1
	Medellín	03	C	1																									1	0	0	0
	Heliconia	04	L	1	1											2										1			5	0	0	0
BOYACÁ	Samondoco	05	L	1	1																							2	1	1	1	
	Chiquinquirá	06	L	1					1													1						3	0	0	0	
	Chiquinquirá	07	L	1	1																							2	0	0	0	
CESAR	Valledupar	08	L	2				1					1								1							5	0	0	0	
META	NI	09	L	1			1												1		1				1			5	1	0	0	
	Villavicencio	10	L	2				1																		1			3	0	0	0
		11	L													1							1				1		4	1	1	0
		12	L											1	1								1				1		4	1	0	0
		13	L	1																				1			1		1	0	0	0
Restrepo	14	L	1																								1	0	0	0		
QUINDÍO	Armenia	15	L	1				1																				2	0	0	0	
SANTANDER	Puente Nacional	16	L	1					1																			2	0	0	0	
TOLIMA	Honda	17	L	1	1		1	1			1				1												1	7	0	0	0	

Tabla 8. Continuación: Relación de muestras colectadas en la investigación, según procedencia, tipo de muestra examinado y técnica de diagnóstico.

Departamento	PROCEDENCIA			TIPO DE MUESTRA EVALUADA																	Tipo de Muestra Total	CULTIVO	PCR	PCR/CULTIVO									
	Municipio	Código Granja	Caso de Campo y Laboratorio	Pulmón	Hisopo pulmón	Meninges	Hisopo Encefalo	Encefalo	Cangijo	Hisopo Articular	Líquido articular	Sangre ventricular	Hisopo ventricular	Hisopo Bronquial	Hisopo abdominal	Líquido abdominal	Bazo	Hígado	Hisopo nasal	Hisopo LCR					LCR	Líquido Torácico	Hisopo Tórax	Tonsila	Pericardico	Líquido pericardico	Hisopo pericardico	Hisopo Pleural	
CUNDINAMARCA	Fusagasuga	18	C	2	1	1			1							1	1				1									9	0	0	0
		19	L	1			1										1					1			1	1				6	1	0	0
	San Fernando	20	C	1																										1	0	0	0
		21	C	1												1														2	0	0	0
	Girardot	22	L	1					1							1														2	0	0	0
		23	L	1				1		1					1															4	0	1	0
	La Vega	24-1	C	1		3	1		1	1						2						2		1					12	0	4	0	
		24-2	C	1	1	3			2			1										2	1	1	1		1	1	16	0	0	0	
		24-3	L	1												2						2				2			6	0	4	0	
		25-1	L	1				1	1		1						1	1										1	4	0	0	0	
		25-2	L	1				1	1		1											1							5	0	0	0	
		26	C	1					2		1					1						1	1	2			1	10	0	0	0		
		27	C	2	1													1		1									4	0	0	0	
		28	L	1					1	1												1	1			1			4	0	0	0	
	Ubate	29-1	C	1				1				1				1						1							4	0	0	0	
		29-2	L	1															1	1						1	1	5	0	2	0		
		29-3	L	1		1		1			1											1							4	0	0	0	
		29-4	L	4																									4	0	0	0	
		30	L	1																									1	1	0	0	
		31	L	1																			1						2	2	1	1	
		32	L	1				1															1						1	0	0	0	
	Sasaima	33-1	C	1																									1	0	0	0	
		33-2	L	1		1			1		1	1			1							1							7	0	0	0	
	Bogota	34	C	1					2		1				1														5	0	0	0	
	Guaduas	35	C	5					1			3	1				2	1				2			3				18	1	0	0	
	Sopo	36	L	1	1			1		2								1				1	1					9	1	3	1		
	Tibirita	37	L	1													1								1			3	0	0	0		
	Chipaque	38	L	1												1							1				1	4	2	2	1		
	Guayabal de	39-1	L	1		1																1							2	0	0	0	
		39-2	L	1				1							1								1				1	5	0	1	0		
	Nocaima	40	L	1	1																								2	0	0	0	
		41	L	1				1														1							3	0	0	0	
		42	L	1		1			1		1	1				1						1						7	0	1	0		
	Tena	43	L	1					1						1							1						4	0	0	0		
	Silvania	44	L	1			1	1												1								3	0	1	0		
	La Mesa	45	L	1																								2	1	1	1		
	Fomeque	46	L	1	1										1										1			4	1	1	1		

2). Granjas: La recolección de muestras se hizo aleatoriamente en 77 granjas porcinas intensivas localizadas en diferentes regiones geográficas de Colombia, a partir de las cuales se colectó un total de 93 casos.

3). Tipo de muestreo. La colección de muestras y datos se llevó a cabo en dos partes: un muestreo en campo y otro en laboratorio.

- **Muestras colectadas de campo.** Fueron remitidas específicamente para este proyecto, por tratarse de muestras ingresadas por proyecto de investigación, en el centro de recepción de muestras del LNDV-ICA (Tabla 9). Estas muestras se caracterizaron por no radicarse en el sistema, no asignársele un número de caso y seguir un protocolo de muestreo (Anexo 1), en el cual se incluyó la información básica de la granja con su respectiva procedencia geográfica, identificación del animal muestreado, tipo de explotación (Tabla 10), los problemas clínicos más comúnmente encontrados (presencia de signos y síntomas del animal) (Tabla 11), edad, ciclo de reproducción en la granja, porcentaje de morbilidad y mortalidad y fecha de vacunación, tipo de vacunación empleada (Tabla 12).

De 445 muestras, se analizaron 184 muestras de campo, a partir de las cuales los tejidos más predominantemente colectados fueron: líquido abdominal, pulmón, líquido de pericardio y LCR. No se colectaron muestras a partir de hisopo articular, hisopo bronquial, hisopo ventricular e hisopo nasal. Las muestras se colectaron en los departamentos del Valle del Cauca, Cundinamarca y Antioquia, los cuales estuvieron conformados por 14 municipios. Se evaluó un total de 16 granjas porcinas intensivas y 23 casos, en los cuales se determinó que únicamente 2 granjas tenían más de un caso. La granja 07 ubicada en la Vega-Cundinamarca presentó 2 casos y la granja 15 ubicada en Cartago – Valle del Cauca, presentó 7 casos (Tabla 9).

Tabla 9. Relación de muestras colectadas en campo, según su procedencia y tipo de muestra.

PROCEDENCIA			TIPO DE MUESTRA EVALUADA														Total Muestras									
Departamento	MUNICIPIO	GRANJA	Pulmón	Hisopo Pulmón	Meninges	Hisopo Encéfalo	Encéfalo	Ganglios	Sangre Articular	Sangre Ventricular	Hisopo Abdominal	Líquido Abdominal	Bazo	Hígado	Hisopo LCR	LCR		Líquido Torácico	Hisopo Torácico	Tonsila	Pericardio	Líquido Pericárdico	Hisopo Pericardio	Hisopo Pleural		
ANTIOQUIA	Don Matias	01														2			1			1			4	
	La Ceja	02	2						1	1															4	
	Medellín	03	1																						1	
CUNDINAMARCA	Fusagasuga	18	2	1	1			1					1	1		1					1				9	
	San Fernando	20	1																						1	
	Girardot	21	1									1													2	
	La Vega	24-1	1			3	1		1	1		2						2				1				12
		24-2	1	1	3				2	1		1					2		1	1	1			1	1	16
		26	1						2	1		1					1		1	2				1	1	10
		27	2	1											1											4
	Ubate	29-1					1				1	1					1								4	
	Sasaima	33-1	1																						1	
	Bogota	34	1					2	1			1													5	
Guaduas	35	5					1		3			2	1		2				3			1		18		
VALLE	Palmira	75		2							1										1				4	
	Cartago	76-1	3				5	1	2		2	3					3	2		3		6			30	
		76-2										1					1									2
		76-3										3						3				3				9
		76-4										1										1				2
		76-5	2				1					3					4	1				1				12
		76-6	1		1	2			2		1	5			2			2				3				19
76-7										6					1	1				3				11		
Buga	77							2												1			1	4		
TOTAL	14/48	16/77	25	5	8	3	7	12	8	7	4	28	3	3	2	17	12	2	7	7	18	4	2	184/445		

Por otro lado, se observó en las características clínicas de los animales en campo, que el tipo de explotación más afectado por *H. parasuis* en las piaras examinadas, fue el de tipo cría-precebo, en los departamentos de Antioquia y Valle; mientras que en el departamento de Cundinamarca predominó la explotación de ciclo completo (Tabla 10).

Tabla 10. Relación de muestras colectadas en campo, según el tipo de explotación empleado en granja y su procedencia geográfica.

Departamento	Municipio	Granja	Tipo de explotación								
			Ciclo completo	Cria-precebo	Levante-ceba	Cama profunda	Un sitio	Dos sitios	Tres sitios	NID	
ANTIOQUIA	Dn/Matías	01		X							
	La Ceja	02		X				X			
	Medellín	03		X			X				
CUNDINAMARCA	Fusagasuga	18		X							
	San Fernando	20								X	
	Girardot	21								X	
	La Vega	24-1		X			X				
		24-2		X							
		26		X				X			
		27								X	
	Ubate	29-1		X				X			
	Sasaima	33-1								X	
	Bogota	34		X							
Guaduas	35			X			X				
VALLE	Palmira	75	X								
	Cartago	76-1		X				X			
		76-2			X						
		76-3			X						
		76-4			X						
		76-5			X						
		76-6			X						
	76-7			X		X					
Buga	77	X				X					
TOTAL		16	7	12	1	0	3	5	0	4	

NID: NO IDENTIFICA

Los problemas clínicos más comúnmente encontrados en las muestras colectadas en campo, según la información suministrada en el protocolo de muestreo, fueron de tipo nervioso, entre la 3 y 6 semanas, seguido de problemas respiratorios entre la 6 y 9 semana de edad y los signos articulares se presentaron en su mayoría, alrededor de la 3 y 6 semana de edad (Tabla 11).

Tabla 12. Relación de muestras colectadas en campo, según el tipo de medicación y vacunación empleado en granja y su procedencia geográfica.

Departamento	Municipio	Granja	Medicación			Vacunación			
			SI	NO	NID	SI	NO	NID	
ANTIOQUIA	Dn/Matías	01		X			X		
	La Ceja	02		X			X		
	Medellín	03	En inyección: Penicilina benzatinica				X		
CUNDINAMARCA	Fusagasuga	18		X			X		
	San Fernando	20			X			X	
	Girardot	21			X			X	
	La Vega	24-1	En Alimento Dosis: Tilmicosina 1,5 Kg./Ton.					X	
		24-2	En Alimento Nuflor 2 Kg./Ton (6-7Sem) Lincoespectin 2 Kg./Ton (4-5 sem)					X	
		26	En Agua. Edad: 42 sem Dosis: Amoxicilina 16-20mg/Kg. y Nuflor 2 Kg./Ton				Comercial Edad:18-32 sem.		
		27			X				X
	Ubate	29-1	En Agua. Amoxicilina 20 ml/Kg.				Comercial Edad: 3 y 5 sem		
	Sasaima	33-1			X				X
	Bogota	34		X			X		
Guaduas	35		X			X			
Palmira	75		X			X			
VALLE	Cartago	76-1	En Alimento: Amoxicilina 400 g /T Lincoespectin 2 Kg. /T				Comercial Edad: No especifica		
		76-2	En Alimento: 4-10 sem Dosis: amoxicilina 20 mg/Kg.					X	
		76-3	En Agua: Ac. Acetilsalicílico 40 mg/Kg y Amoxicilina 20 mg/Kg.				Comercial Edad: 21-35 días.		
		76-4	En Agua Edad 8 sem Dosis: Amoxicilina 20 mg/Kg. y Ac. Acetil salicílico 40mg/Kg.				Comercial Edad: 3-5 sem.		
		76-5	En Alimento: 41-56 días. Amoxicilina 400 g/Ton y Lincoespectin 2 Kg./T				Comercial Edad: 35 días.		
		76-6	En Alimento: 6-9 semanas. Amoxicilina 20mg/Kg.					X	
		76-7		X				X	
	Buga	77	En Alimento: Florfenicol 2 Kg./Ton. (4-10 Semanas)				Autovacuna Edad: 1-3 sem		

NID: NO IDENTIFICA

- **Muestras colectadas en laboratorio.** Fueron remitidas al LNDV-ICA e incluidas dentro del estudio por tratarse de muestras procedentes de animales con signos clínicos característicos de la enfermedad y no seguir un protocolo único de muestreo (Tabla 13). Se analizó un total de 261 muestras, siendo las más predominantes pulmón, hisopo de encéfalo, hisopo de pulmón, líquido abdominal y en LCR. Sin embargo, no se recolectaron muestras de tonsilas.

Las muestras se colectaron en los departamentos de Cundinamarca, Meta, Boyacá, Tolima, Antioquia, Valle del Cauca, Cesar, Quindío y Santander y distribuidas en 40 municipios. Se evaluó un total de 64 granjas porcinas intensivas a partir de 70 casos, en los cuales se determino que únicamente 4 granjas tenían más de un caso. La granja 20 ubicada en la Vega-Cundinamarca presento 2 casos, la granja 22 ubicada en la Ubate-Cundinamarca presento 3 casos, la granja 30 ubicada en Guayabal de Siquima- Cundinamarca presento 2 casos y la granja 42 ubicada en San Antonio del Tequendama-Cundinamarca presento 3 casos (Tabla 13).

Tabla 13. Relación de muestras colectadas en laboratorio, según su procedencia y tipo de muestra.

PROCEDENCIA			TIPO DE MUESTRA EVALUADA																		Tipo de Muestra Total						
Departamento	Municipio	Cranja	Pulmon	Hisopo pulmón	Meninges	Hisopo Encefalo	Encefalo	Ganglios	Hisopo Articular	Líquido articular	Sangre ventricular	Hisopo ventricular	Hisopo Bronquial	Hisopo abdominal	Líquido abdominal	Bazo	Hígado	Hisopo mesal	Hisopo LCR	LCR		Líquido Torácico	Hisopo Tóraxico	Pericardio	Líquido pericardico	Hisopo pericardico	Hisopo Pleural
ANTIOQUIA	Heliconia	04	1	1											2									1			5
BOYACÁ	Samondoco	05	1	1																							2
	Chiquinquirá	06	1						1													1					3
CESAR	Valledupar	07	1	1																							2
	NI	08	2				1						1							1	1			1			5
META	Villavicencio	09	1			1												1	1					1			5
		10	2				1																				3
		11													1								1	1	1		4
		12											1	1	1								1		1		4
		13	1																				1		1		1
Restrepo	14	1																								1	
QUINDÍO	Armenia	15	1			1																				2	
SANTANDER	Puente Nacional	16	1				1																			2	
VALLE	Palmira	74					2							1									1			4	
TOLIMA	Honda	17	1	1		1	1			1				1										1		7	
CUNDINAMARCA	Fusagasuga	19	1			1										1				1		1	1			6	
	Girardot	22					1							1												2	
	La Vega	23	1			1			1					1													4
		24-3													2							2		2			6
		25-1	1														1	1								1	4
		25-2	1					1	1		1										1						5
		28							1												1	1					4
	Ubaté	29-2	1																1	1					1		5
		29-3				1		1			1									1							4
		29-4	4																		1						4
		30	1																								1
	Sasaima	31	1																			1					2
		32					1																				1
	Sopo	33-2	1		1			1		1	1			1						1		1					7
	Tibirita	36	1	1			1		2								1	1		1	1	1				9	
	Chipaque	37	1														1				1	1	1			3	
	Guayabal de Siquima	38	1											1									1		1		4
		39-1				1															1						2
		39-2	1			1								1								1			1		5

Tabla 13. Continuación: Relación de muestras colectadas en laboratorio, según su procedencia y tipo de muestra.

PROCEDENCIA			TIPO DE MUESTRA EVALUADA																	Tipo de Muestra Total									
Departamento	Municipio	Canga	Rhino	Hsopo pulmón	Meninges	Hsopo Erectilo	Erectilo	Cargilos	Hsopo Articular	Líquido articular	Sangre ventricular	Hsopo ventricular	Hsopo Bronquial	Hsopo abdominal	Líquido abdominal	Bazo	Hígado	Hsopo mesal	Hsopo LCR		LCR	Líquido Torácico	Hsopo Torácico	Pericardio	Líquido pericardico	Hsopo pericardico	Hsopo Pleural		
CUNDINAMARCA	Nocaima	40	1	1																								2	
		41	1					1														1							3
		42	1		1				1	1	1					1						1							7
	Tena	43	1						1						1								1					4	
	Silvania	44					1	1												1								3	
	La Mesa	45	1																		1							2	
	Fomeque	46	1	1												1									1			4	
	San Antonio del Tepezdram	47					1	1				1										1	1						5
		48	1						1																				2
		49	1																										1
		50			1										1														2
		51-1	1	1																			1						3
		51-2	1	1																			1						3
		51-3	1					1																1					4
	Fuquene	52		1	1		1			1					1									1				5	
	La Calera	53	1	1			1	1								1					1	1						7	
		54	1																										1
	Villeta	55	2				5									5								1					13
	Cogua	56	1	1																									2
		57	1																										1
		58	1	1																									2
	Facatativa	59	1																			1	1						4
	Ubaqué	60	2												1												1		4
		61	2				2								1				1										6
	Guaduas	62	1																										1
	Subachoqué	63	1																										1
	Tenjo	64	1				1																						2
	Mosquera	65	1	1																									2
		66	1	1			1																		1				4
		67	1				1	1							1														4
	Choachi	68	1	1												1													4
	Nemocon	69	1					2											2		1								5
	Zipaquira	70	1						1		1			1	1									1		1			7
		71	1				1																		1	1			4
		72	1				1								1									1		1			5
	Chia	73		1						1		1	1		1														4
	TOTAL	40/48	64/77	64	18	4	23	14	11	6	6	4	2	4	12	18	3	2	5	6	17	9	9	4	12	7	1	261/445	

4). Tipo de muestra evaluada. Para la identificación de *H. parasuis*, se colectaron 445 muestras de origen respiratorio y sistémico, procedentes de 25 muestras diferentes en forma aleatoria. Se seleccionaron muestras de tejidos, líquidos e hisopos de animales vivos o de cadáveres remitidos al (LNDV-ICA), a partir de muestras colectadas en campo por el técnico de la granja y que presentaron una epidemiología característica a la de *H. parasuis* (Tabla 14).

Los tejidos empleados en este estudio fueron: pulmón, meninges, encéfalo, ganglios, bazo, hígado, pericardio, pleura y tonsilas, de los cuales se recolectó aproximadamente 20 gramos.

Los líquidos, se obtuvieron por absorción utilizando aproximadamente 0.5 ml y se manejo un lapso de tiempo no mayor a 12 horas desde la colección de las muestras hasta su ingreso al laboratorio. Se colectó, líquido articular, ventricular, abdominal, líquido cefalorraquídeo (LCR), torácico y de pericardio.

Las muestras de hisopos empleadas, se obtuvieron a partir de exudados de pulmón, encéfalo, ventrículo, cavidad abdominal, LCR, tórax, pericardio y pleura. Para su colección se emplearon hisopos de algodón cuando las muestras tardaron menos de 12 horas en llegar al laboratorio; mientras, que los hisopos con medio AMIES suplementados con carbón (BD-220121), se emplearon cuando las muestras tardaron más de 12 horas, debido a la ubicación geográfica de la granja y así mantener la viabilidad del microorganismo en estudio.

Tabla 14. Relación de los diferentes tipos de muestras empleados, según la técnica de diagnostica empleada en *H. parasuis*.

Tipo de muestra	Total muestra analizada	Técnica de diagnostico de <i>H. parasuis</i>			
		CULTIVO		PCR	
		Positivo	% Cultivo positivos	Positivo	% PCR positivos
Pulmón	89	14	15,7	11	12,4
Hisopo pulmón	23	3	13,0	3	13,0
Meninges	12	0	0,0	0	0,0
Hisopo Encéfalo	26	1	3,8	1	3,8
Encéfalo	21	0	0,0	0	0,0
Ganglios	23	0	0,0	0	0,0
Hisopo Articular	6	0	0,0	3	50,0
Líquido articular	15	0	0,0	0	0,0
Líquido ventricular	10	0	0,0	0	0,0
Hisopo ventricular	3	0	0,0	0	0,0
Hisopo Bronquial	4	0	0,0	0	0,0
Hisopo abdominal	15	2	13,3	5	33,3
Líquido abdominal	47	3	6,4	4	8,5
Bazo	6	0	0,0	0	0,0
Hígado	5	0	0,0	0	0,0
Hisopo nasal	5	0	0,0	0	0,0
Hisopo LCR	8	0	0,0	2	25,0
LCR	34	0	0,0	0	0,0
Líquido Torácico	21	4	19,0	7	33,3
Hisopo Tórax	11	1	9,1	2	18,2
Tonsila	7	0	0,0	0	0,0
Pericardio	11	1	9,1	1	9,1
Líquido de pericardio	30	2	6,7	1	3,3
Hisopo de pericardio	10	2	20,0	1	10,0
Hisopo Pleural	3	0	0,0	1	33,3
TOTAL	445	33	7,4	42	9,4

2.3. DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO.

Para el aislamiento bacteriológico del *H. parasuis*, se siguió el protocolo descrito por Oliveira y col (2001) y Olvera y col (2007) y el manual de procedimientos del laboratorio de bacteriología del LNDV-ICA. La preparación de medios y soluciones se describen en el Anexo 2.

Cada tejido individualmente se macero dentro de una bolsa Nasco y por medio de un hisopo de algodón estéril se procedió a sembrar la muestra en una caja de petri con Agar base sangre ó Agar chocolate. Luego, con la ayuda de un asa estéril se extendió la muestra homogéneamente con una siembra masiva en la superficie de la caja y finalmente se le realizó una estría de satelitismo en la parte central de la caja con *Staphilococcus aureus* a través del área de la primera y segunda estría (Figura 9). Este paso se realizo para cada una de las muestras colectadas.

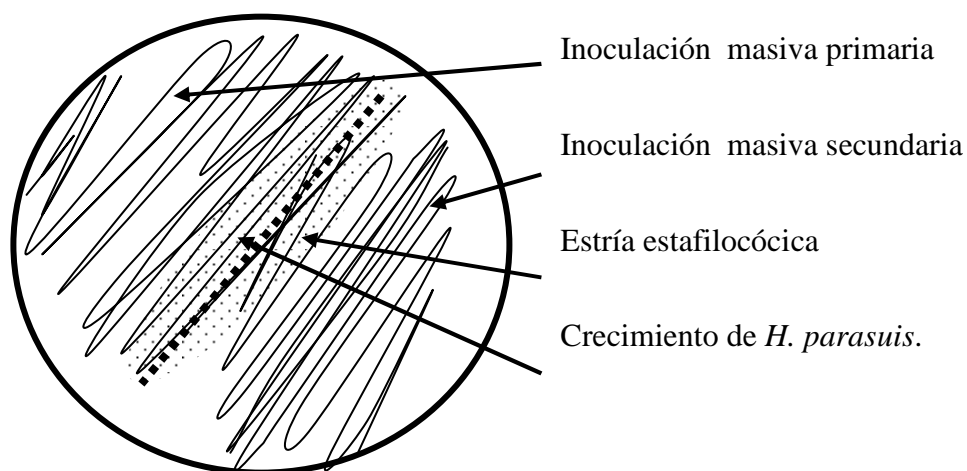


Figura 9. Esquema de satelitismo para el aislamiento de *H. parasuis*.

Debido a que los tejidos procedentes de muestras de campo, usualmente tienen una alta carga microbiológica, se realizó un repique de estas colonias, para evidenciar su crecimiento contiguo a la estría de *S. aureus* en Agar base sangre y así lograr purificar las cepas sospechosas. Para el caso de las muestras procedentes de exudados líquidos, se tomó un hisopo de algodón estéril y se introdujo en el líquido hasta que estuviera suficientemente humedecido con la muestra. A continuación, el hisopo se pasó por un extremo del medio y se siguió el procedimiento previamente descrito.

Posteriormente, las cajas de petri con Agar sangre o Agar chocolate, se incubaron a 37°C por un período de 24-48 horas en condiciones de microaerofilia con 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas fueron observadas para buscar la presencia de *H. parasuis*, evidenciándose como colonias de tamaño pequeño, puntiforme, translúcidas y ligeramente mucosa, asemejándose a una gota de rocío y con crecimiento satelital, alrededor de la estría de *Staphilococcus aureus* (Figura 10).

Cuando las muestras presentaron crecimiento de flora acompañante, se purificó las colonias presuntivas de *H. parasuis* y se realizó un subcultivo en una nueva placa de Agar Sangre por un período de 24 a 48 horas en las condiciones descritas anteriormente.

Cuando la colonia exhibía estas características, se realizó un frotis a cada una de las colonias sospechosas y se hizo una tinción de Gram, para observar en su morfología, el predominio de coco-bacilos Gram negativos pleomórficos, para luego proceder con la caracterización bioquímica. En el Anexo 3 se detalla el flujograma empleado en el aislamiento del *H. parasuis*.

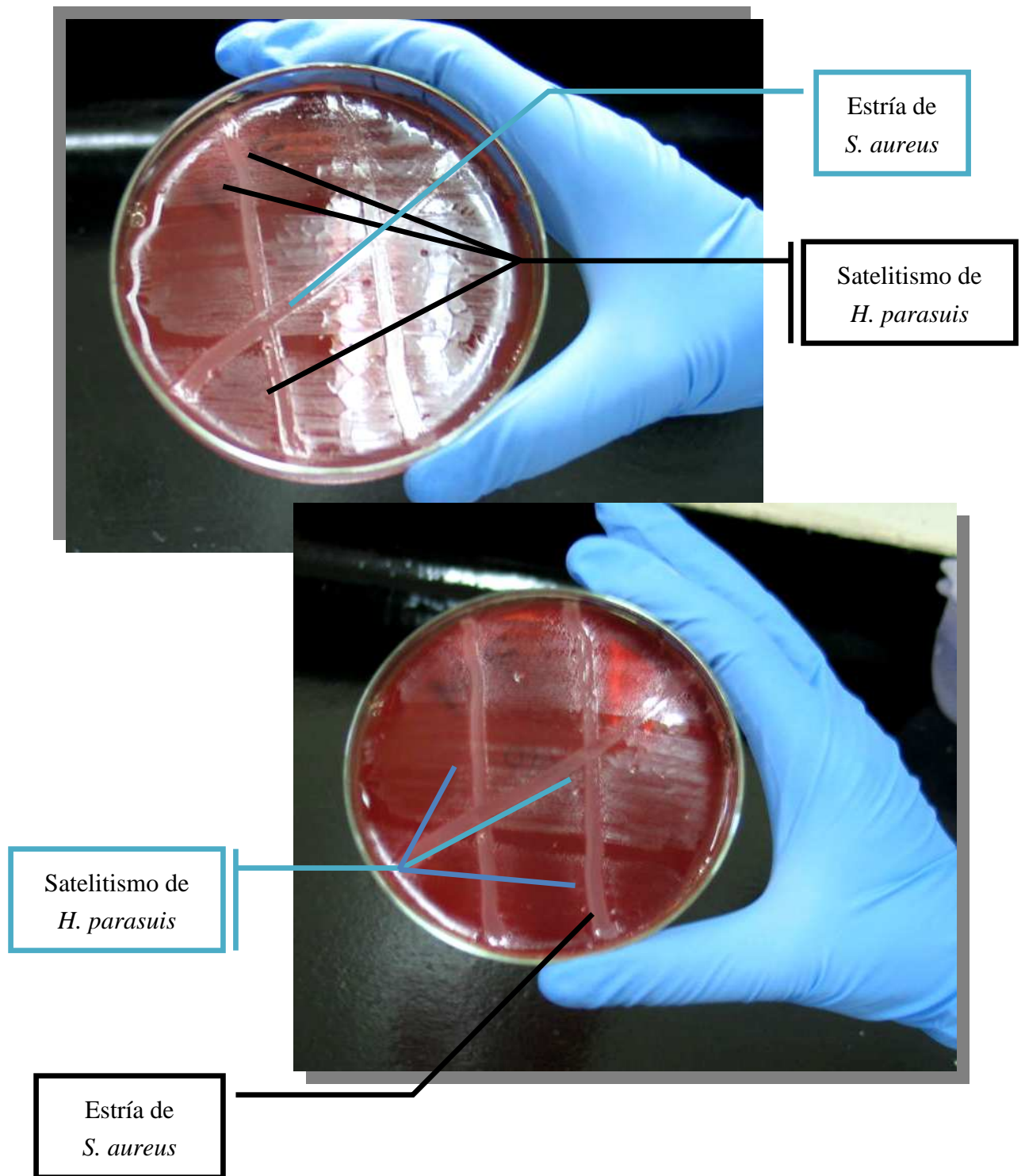


Figura 10. Imágenes de un crecimiento típico de *Haemophilus parasuis* frente a una estría de *S. aureus*.

2.3.1. Pruebas Bioquímicas.

Luego de confirmar la presencia de cocos Gram negativos, se analizaron las colonias sospechosas con la batería de pruebas bioquímicas, de acuerdo a las recomendaciones descritas en la literatura (Møller y Kilian, 1990 y Olvera y col, 2007). Las pruebas aplicadas para la confirmación bioquímica de *H. parasuis* fueron: Catalasa, Prueba de CAMP, Bilis Esculina, Urea, Inulina, Trealosa., Sorbitol y Manosa. Finalmente, dichos medios fueron incubados a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 ± 2 horas en condiciones de microaerofilia.

Las colonias de casos positivos de *Haemophilus parasuis* obtenidas en el estudio, se preservaron en el banco de cepas de bacteriología del Laboratorio de Diagnostico de Medicina Porcina, para posteriores estudios. Las cepas que se llevaron a conservar fueron cultivadas previamente en Agar Sangre por 24 horas con satelitismo de *S. aureus*, posteriormente se tomo un hisopado de las colonias típicas y se paso a un criovial con 3 ml de caldo Skim milk al 1% y 1 ml de glicerol previamente esterilizado, se retiró el hisopo y el caldo se llevo a una temperatura de -70°C , con la finalidad de mantener una viabilidad aproximada de dos años.

2.3.2. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Para el análisis de la sensibilidad antimicrobiana se utilizó el método descrito por Kirby-Bauer modificado, para la evaluación de microorganismos de crecimiento fastidioso, como es el caso de *H. parasuis*. Para este fin, se reemplazó el medio de cultivo tradicional de Agar Mueller Hinton, comúnmente empleado en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, por el medio de cultivo selectivo Agar chocolate, el cual se suplementó con un vial de Vitox (OXOID), para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias Gram negativas fastidiosas.

Únicamente en aquellos aislamientos positivos, en los que se obtuvo un buen crecimiento y viabilidad por un periodo mayor a 2 días, se realizó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Inicialmente, se tomó con una asa estéril, una suspensión del cultivo bacteriano puro y se resuspendió en 2 ml de solución salina fisiológica (0.85 % p/v), hasta que la suspensión alcanzó una turbidez del inóculo equivalente al tubo N° 0.5 de la Escala del patrón de Mac Farland (Anexo 4 y 5). Posteriormente, con un hisopo estéril de algodón, humedeció con la suspensión anterior, se extendió en forma masiva sobre cada placa, de acuerdo con el procedimiento reportado en la guía de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002).

En las placas de Agar Chocolate, se dispusieron los antibióticos (en forma de sensidiscos), utilizando un dispensador automático de sensidiscos, en un ángulo opuesto de aproximadamente 60°C. A continuación, cada placa con sus respectivos sensidiscos, se incubó a 37°C en jarra de anaerobiosis, para brindarle condiciones de microaerofilia con 5 – 7 % CO₂, por un período de 20-24 horas.

Para el estudio de sensibilidad antimicrobiana, se evaluaron 20 antibióticos, comúnmente empleados para especies de *Haemophilus spp*, como son: Amikacina (AK), Amoxicilina (AMX/AML), Ampicilina (AMP), Cefoxitina (FOX), Ceftazidina

(CAZ), Ceftiofure (FUR), Ciprofloxacina (CIP), Enrofloxacina (ENR), Florfenicol (FFC), Fosfomicina (FOS), Gentamicina (CN), Kanamicina (K), Lincomycina (MY), Neomicina (N), Norfloxacina (NOR), Oxitetraciclina (OT), Tetraciclina (TE), Trimetroprim-sulfametoxazol (SXT), Colisina (COL) y Cloranfenicol (C).

La lectura se hizo midiendo con una regleta el halo de inhibición de crecimiento (mm) y se comparo los resultados obtenidos con la tabla de datos suministrados por la casa productora, donde se presentan los parámetros de resistencia y sensibilidad de *H. parasuis* frente a cada antibiótico evaluado, como se especifica en la Tabla 15.

Tabla 15. Parámetros de sensibilidad y resistencia de *H. parasuis* frente a los antibióticos empleados en este estudio.

Nombre del Antibiótico	Abreviación	Casa Comercial	Concentración en sensibilizadores (µg)	Susceptibilidad (mm)	Resistencia (mm)
Amikacina	AK	Oxoid	30	≥ 17	≤ 14
Amoxicilina	AMX/AML	Oxoid	20/10	≥ 20	≤ 19
Ampicilina	AMP	Oxoid	10	≥ 22	≤ 18
Cefoxitin	FOX	Promega	10	≥ 15	≤ 12
Ceftazidime	CAZ	Oxoid	30	≥ 26	-
Ceftiofure	FUR	BBL		≥ 21	≤ 17
Ciprofloxacina	CIP	Oxoid	5	≥ 21	-
Enrofloxacina	ENR	Oxoid	5	≥ 20	≤ 16
Florfenicol	FFC	Britania	30	≥ 16	≤ 21
Fosfomicina	FOS	Oxoid	50	≥ 16	≤ 12
Gentamicina	CN	Oxoid	10	≥ 15	≤ 12
Kanamicina	K	Oxoid	30	≥ 18	≤ 13
Lincomycin	MY		2	≥ 17	≤ 14
Neomicina	N	Oxoid	30	≥ 17	≤ 12
Norfloxacina	NOR	Oxoid	10	≤ 17	≤ 12
Oxitetraciclina	OT	Oxoid	30	≥ 19	≤ 14
Tetraciclina	TE	Oxoid	30	≥ 29	≤ 25
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT	Oxoid	1,25/23,75	≥ 16	≤ 10
Colisina	COL	BBL	30	≥ 18	≤ 12
Cloranfenicol	C	Oxoid	30	≥ 29	≤ 25

2.4. DIAGNOSTICO MOLECULAR.

2. 4. 1. Procedimiento de preparación de las muestras, para la extracción de ADN de *H. parasuis*.

Previamente a la extracción del ADN de *H. parasuis*, se realizo una preparación de los diferentes tipos de muestras empleados en esta investigación, como se describe a continuación:

- **Los cultivos bacteriológicos positivos**, se cultivaron en placas de agar base sangre con satelitismo de *Staphilococcus aureus* (ATCC No.12605), se caracterizaron bioquímicamente y se incubaron por 48 horas hasta que las colonias típicas del *H. parasuis*, alcanzaron un crecimiento logarítmico no mayor a 2×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC). Luego se tomo una alícuota con un asa estéril y se resuspendió en 5 ml aproximadamente de solución salina estéril (0.85% p/v). De esta suspensión, se tomo 1 μ l y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, a partir de la cual se realizo la extracción del ADN.
- **A partir de los exudados líquidos**, colectados a partir de líquido pericárdico, abdominal, torácico ó LCR, se tomó 200 μ L y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- **Los tejidos**, se colectaron, en una cantidad aproximada de 50 – 100 mg, en un tubo eppendorf de 1.5 ml, con la finalidad de conservar futuras muestras del caso. A partir de este primer tubo se tomo para la extracción 25 mg del tejido, de acuerdo a lo reportado por Lora A, (2002), en la cual se recomienda esta cantidad de tejido con el fin de obtener una alta concentración de ADN y se deposito en un segundo tubo eppendorf de 1.5 ml, en el cual se adicionó 300 μ l de solución tampón salina de fosfato (PBS, pH 7.4) y posteriormente dicha mezcla se macero con un pestler por 1 minuto.

- **A las muestras colectadas con hisopos**, se procedió a tomar con unas pinzas la cabeza del hisopo e introducirla en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Luego el cuerpo del hisopo que sobresalía del tubo se cortó y se le adiciono 300 μ L de PBS. Se cerró el tubo y se mezcló en el vortex durante un minuto, para que la muestra recolectada con el hisopo se homogenizara con el PBS (Oliveira y col, 2001).

2.4.2. Extracción de ADN de *H. parasuis*, por el método de Proteínasa K y Fenol-cloroformo-isoamílico.

A partir de de la preparación preliminar de las muestras de cultivos, exudados líquidos, tejidos e hisopos anteriormente descrita, se procedió a realizar la extracción de ADN utilizando el método de Proteínasa K y Fenol-cloroformo-isoamílico, para la recuperación del ADN de *H. parasuis*. La preparación de los reactivos y soluciones empleadas en el proceso de extracción de ADN, se describen en el Anexo 6.

El método de Proteínasa K y Fenol-cloroformo-isoamílico incluye cinco pasos fundamentales: Homogenización, Separación de fases, Precipitación del ADN, Lavado del ADN y resuspensión del ADN.

- **Homogenización.** Se partió de un volumen de 200 μ L de cada muestra y se centrifugó a 20.800 gravedades por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se aspiró el sobrenadante y el “pellet” fue resuspendido en 200 μ L de PBS (50mM de Tris-HCl, 1mM EDTA, [pH 7.4]), empleando vortex durante un minuto (Oliveira y col, 2001; San Millan y col, 2007). Luego, en cada tubo eppendorf se adicionó 10 μ l de Proteínasa K con una concentración de 10 mg/ml (Invitrogen, Cat. No. 25530-015) y se incubó por un periodo de 1- 3 horas, en baño serológico a 55°C (Sambrook y col, 1989; Lo y col, 1998; Oliveira y col, 2001 y San Millan y col, 2007).

- **Separación de fases.** Se dejaron enfriar los tubos y se les adiciono 220 μ l de la mezcla Fenol-Cloroformo-Isoamílico (Invitrogen, Cat. N°. 15593-049), se taparon y se mezclaron manualmente por inversión suave, para luego centrifugarlos a 15.300 gravedades por 15 minutos para permitir el aislamiento del ADN intacto.
- **Precipitación.** La fase superior acuosa (donde se encuentra el ADN), fue transferida a un segundo tubo de 1.5 ml, en el cual se había agregado previamente 1 ml de etanol absoluto frío (Merck, Ref: K32.983183), para precipitar el ADN. El tubo se mezcló por inversión suave, se llevó a incubar durante dos horas a -20°C . Luego se centrifugo por 10 minutos a 20.800 gravedades.
- **Lavado.** Luego se descarto el sobrenadante y el sedimento fue lavado utilizando 1 ml de etanol al 70% v/v, se mezcló manualmente hasta que se desprendió totalmente el sedimento del tubo y se llevó nuevamente a centrifugación a 20.800 gravedades por 5 minutos.
- **Resuspensión.** Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y el sedimento húmedo se llevó a secar por una hora, en un horno de aire seco, a una temperatura de 60°C . Luego, el sobrenadante se resuspendió en 60 μ l de agua DEPC tratada con dietilpirocarbonato (SIGMA, D5758), libre de nucleasas y se incubó por 1 hora a 65°C en el baño serológico, con el fin de disolver el ADN. El ADN fue almacenado a -70°C para su posterior utilización.

En el Anexo 7, se presenta el flujograma para la extracción del ADN.

2.4.3. TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA *H. parasuis* (PCR Hps).

El procesamiento de las muestras para detectar el Ácido Nucleico (ADN) de *H. parasuis* se realizó por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) descrita por Oliveira y col, (2001) y Angen y col, (2007), en la cual se empleó dos regiones especie-específicas para el genoma de la bacteria *H. parasuis*, a partir de las cuales se diseñó una pareja de iniciadores HPS-F y HPS-R, con un tamaño predictivo de amplificación de 821 pares de bases (pb).

Para el análisis bioinformático, se empleó la base de datos de genética, del Centro de Información Biotecnológico Nacional de los Estados Unidos [National Center for Biotechnology Information, NCBI], con la finalidad de comparar la similaridad de las secuencias de los iniciadores utilizados en esta investigación con las secuencias reportadas en esta base de datos. Por este motivo, se accedió a la Herramienta de Búsqueda Básica de Alineamiento Local [Basic Local Alignment Search Tool, BLAST], que se encuentra en la base de datos anterior y se buscó la similitud entre las secuencias de los nucleótidos de los iniciadores empleados y las secuencias reportadas por otros investigadores en el GenBank. El alineamiento pareado de las bases, demostró que las secuencias de iniciadores utilizadas (Tabla 16), presentaron alineamiento exclusivamente para el *H. parasuis*.

Por otro lado, los oligonucleótidos de las secuencias de los iniciadores se analizaron en el programa Integrated ADN Technologies (IDT XX), en el cual se pudo determinar que la secuencia del iniciador HPS-F tenía un contenido de GC de 55.0%, una temperatura de anillamiento de 63.2 °C y un peso molecular de 6333.1 g/mol y que la secuencia del iniciador HPS-R tenía un contenido de GC de 61.1%, una temperatura de anillamiento de 63.0°C% y un peso molecular de 5417.5 g/mol. Asimismo, la concentración ajustada por reacción de los oligonucleótidos en los iniciadores se estimó que fue de 0.3 µM, la del magnesio de 1.5mM y la de los

dNTPS de 0.2mM. Los iniciadores fueron sintetizados por INVITROGEN.

Tabla 16. Iniciadores empleados en la normalización de la técnica de PCR para *H. parasuis*.

Nombre del iniciador	Secuencia (5' - '3')	Longitud (pb)	Posición	Gen Bank accesión No.
HPS-F	GTGATGAGGAAGGGTGGTGT	20	440-459	M75065
HPS-R	GGCTTCGTCACCCTCTGT	18	1243-1260	M75065

Las condiciones de la prueba de PCR, para una concentración final por tubo fueron las siguientes: Para un volumen final de 20 µl, se empleo un tampón de PCR 1X (Promega, Catalog N°. M1865), 1.5mM de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) (Promega, Catalog N°. M1865), 0,2 mM de cada dNTP (ATP, GTP, CTP, TTP) (Promega, Catalog N°. U1240), 0,3 µM de cada iniciador: HPS-F y HPS-R, (Invitrogen, Estados Unidos), 0,03U/µl de la enzima ADN Polimerasa Go Taq Flexi (Promega, Catalog N°. M8295). El flujograma del protocolo de la técnica de PCR, se describe en el Anexo 8.

Algunas de las modificaciones realizadas en el protocoló de la PCR por el investigador, fueron: La cantidad de ADN extraído de las muestras del estudio se aumento de 1 a 4 µl y la concentración empleada de la enzima Taq polimerasa se disminuyo de 0.5U/µl a 0,03U/µl.

La amplificación se realizó en un termociclador (PERKIN ELMER GENEAMP PCR System 2400), en el cual se programaron los ciclos en las siguientes condiciones:

- Denaturación Inicial:** 94°C por 5 minutos.
- **Seguida de 30 ciclos compuestos de:**
 - **Denaturación:** 94°C por 30 segundos.
 - **Anillamiento:** 59 °C por 30 segundos.
 - **Extensión:** 72°C por 2 minutos.
- **Extensión final:** 72°C por 5 minutos.
- **Infinito:** 4°C.

Posteriormente, para la visualización de los productos, se realizó una electroforesis en gel de Agarosa Tipo II (SIGMA, A6877), en una unidad horizontal de una sola dimensión. El gel se preparó al 1.5% p/v preparado en tampón TBE (89 mM de base Tris-acetato, 89 mM de ácido bórico, 2.4 mM de EDTA sodio a pH 8.3) y teñido en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml (Promega, Catalog N° H5041). La preparación de los reactivos y soluciones empleadas en el montaje de la electroforesis, se describe en el Anexo 9.

En el montaje de la electroforesis, se dispensaron 2 µl de tampón de carga y 10 µl de producto de amplificación de PCR en el gel. Se utilizó un patrón de peso molecular de 100 bp (Promega, Catalog N°. G2101) y un tampón de carga (Invitrogen, Catalog N°. 10816-015). La electroforesis se corrió con corriente continua de 120 voltios con una fuente de poder, durante 30 minutos (Oliveira y col, 2001). El producto de 821 bp, fue considerado positivo para *H. parasuis*. Estos productos fueron fotografiados bajo luz ultravioleta en un transiluminador (Sigma Co, USA), con una cámara Polaroid manual y una película de 667, (Maniatis, T, y col, 1982; En Lora, 2002). El flujograma del protocolo de la electroforesis se describe en el Anexo 10.

2.4.3.1. Determinación de la sensibilidad de la técnica de PCR para *H. parasuis*.

La prueba de sensibilidad (ó limite de detección), busca identificar los verdaderos positivos y la mínima cantidad de acido nucleico de *H. parasuis*, que la prueba de PCR-Hps puede detectar con confiabilidad en el diagnostico de laboratorio. Para esto, se partió del cultivo de la cepa empleada como control positivo de *H. parasuis* Tipo II de la Universidad Minessota, (Mogollón, 1998).

En un espectrofotómetro de luz ultravioleta, NanoDrop–1000 Spectrophotometer (Thermo-Scientific, U.S.A), se realizó la lectura por duplicado del ADN del control positivo descrito anteriormente, con una longitud de onda de 260 nm (1 unidad de densidad óptica = 50 µg/ml), a partir de una suspensión bacteriana ajustada al tubo No 0.5 del patrón de Mac-Farland, correspondiente a una concentración con una densidad celular de 2×10^8 UFC/ml⁻¹. Obteniéndose, una lectura de absorbancia de 0.1426 nm y una concentración de ADN de 507 ng/µl, lo cual demuestra una alta sensibilidad en la prueba de PCR.

A continuación a este control positivo con concentración conocida, se le realizaron diluciones seriadas en base 10 (1/10) hasta 10^{-9} del cultivo de referencia de *H. parasuis*, de acuerdo a lo reportado en el manual de la OIE (2004). Sin embargo, no se observo un límite de visualización en la intensidad de la banda con respecto a la dilución final. Motivo por el cual, se procedió a realizar diluciones en base 5 (□) y así obtener un límite de detección más notorio. De esta manera, se procedió a dispensar 40 µl de agua DEPC en 10 tubos de 0.2 ml y se realizaron diluciones seriadas partiendo del primer tubo en el cual se colocaron 10 µl de ADN, se mezclo y luego se sacaron otros 10 µl de esta mezcla para el siguiente tubo y así sucesivamente hasta llegar al 10 tubo, conservando la relación 1:5, como se observa en la Figura 11.

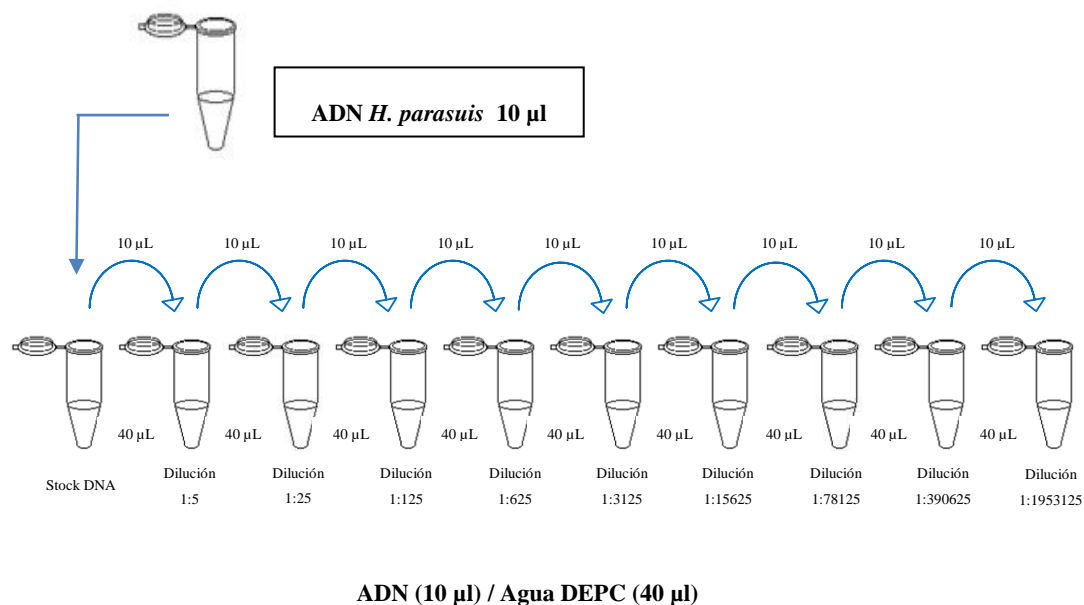


Figura 11. Esquema de diluciones seriadas, empleado en la prueba de sensibilidad a partir de ADN de *H. parasuis*.

Posteriormente, de cada uno de los 10 tubos de dilución, se le extrajo 4µl de ADN y se siguió la metodología de PCR y electroforesis, anteriormente descrita, con la finalidad de determinar hasta que dilución se logra visualizar la banda y así establecer la mínima cantidad de ADN que puede ser detecta por esta prueba de PCR.

2.4.3.2. Determinación de la especificidad de la técnica de PCR para *H. parasuis*.

La prueba de especificidad se determinó empleando patógenos genéticamente similares a los que comúnmente se encuentran contaminando las muestras clínicas del agente a detectar (Binder, 1997a; Manual OIE, 2004; Farmacopea Europea, 2007). Para dicha demostración se emplearon diferentes microorganismos que presentaron una estrecha relación filogenética, con el microorganismo en estudio (Farmacopea Europea, 2007).

En la determinación de la prueba de especificidad de la técnica de PCR, se utilizó como control positivo la cepa de referencia de *H. parasuis* y cuatro (4) aislamientos de campo tomados al azar, que fueron positivos por PCR. Adicionalmente, se utilizaron cultivos bacteriológicos puros de *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma spp*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp* (Tabla 17).

La extracción del ADN de estos cultivos bacteriológicos y la técnica de PCR, se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para *H. parasuis*, con la finalidad de disminuir el sesgo de error en la ejecución de la prueba.

Tabla 17. Cultivos bacterianos empleados en la prueba de especificidad de la PCR para el diagnóstico de *H. parasuis*.

Especie bacteriana		Identificación del Cultivo y/o Granja	Origen de la muestra	Procedencia del cultivo.	Resultado PCR
1	<i>H. parasuis</i> Tipo II	Control positivo	NI	Universidad Minnesota (Mogollón, Agosto/30/1998)	+
2	<i>H. parasuis</i>	13565-00 / 52	Hisopo articular.	Aislamiento en Campo	+
3	<i>H. parasuis</i>	13570 / 36	Líquido Torácico	Aislado por diagnóstico bacteriológico.	+
4	<i>H. parasuis</i>	12916-00 / 57	Pulmón.	Aislado por diagnóstico bacteriológico.	+
5	<i>H. parasuis</i>	10021-00 / 60	Pulmón.	Aislado por diagnóstico bacteriológico.	+
6	<i>Streptococcus suis</i>	87555	Cepa de serotipo 2.	Colección cepas Porcinos	-
7	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	2947	Serotipo 7 (2006)	Colección Laboratorio Bacteriología.	-
8	<i>Pasteurella multocida</i>	NI	D83	Colección cepas Porcinos	-
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	Referencia No.12605	ATCC	Colección Laboratorio Bacteriología.	-
10	<i>Mycoplasma spp.</i>	1207	Cultivo bacteriológico (14/11/2002)	Colección cepas Porcinos (Roa L, 2007).	-
11	<i>Escherichia coli</i>	NI	NI	Colección cepas Porcinos	-
12	<i>Salmonella spp</i>	NI	NI	Colección cepas Porcinos	-

NI: No Identifica (+) Positivo (-) Negativo

2.4.3.3. Control de calidad de la PCR para el diagnóstico de *H. parasuis*.

Al momento de validar la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se tuvo especial cuidado en el proceso de elaboración, ya que es una técnica muy sensible. Por este motivo, se emplearon tres sitios separados físicamente: zona de extracción, zona de premezclas de PCR y zona de PCR y detección de los productos, con la finalidad de prevenir contaminaciones, originadas por ADN no deseado y por consiguiente un resultado falso positivo. Igualmente, también se empleó instrumental exclusivo para la realización del ensayo, se utilizaron reactivos, tubos estériles, puntas resistentes a aerosoles (con filtro) y también se tuvo especial cuidado de no montar más de 10 muestras por prueba, incluyendo un control negativo conocido, con la finalidad de tener un mejor control y seguridad en los resultados (Binder, 1997b).

Además los guantes del investigador se cambiaron con frecuencia y se utilizaron pipetas exclusivas en cada área. Se realizó desinfección de cada área con hipoclorito de sodio antes de empezar a trabajar y la cabina de PCR se esterilizó con luz ultravioleta por lo menos una hora, antes de comenzar a trabajar en ella. Para evitar la aparición de resultados falsos negativos, producidos generalmente por errores al pipetear y/o presencia de inhibidores, se recomienda emplear controles internos que compiten con la muestra problema (Manual OIE, 2004; Farmacopea Europea, 2007).

Se halló, concordancia entre los resultados obtenidos entre réplicas y en diferentes corridas, por lo que se determinó que las muestras empleadas en esta prueba fueron reproducibles y estables en ensayos repetitivos que se realizaron en el transcurso de la investigación. Esto fue de gran importancia en la estandarización de la PCR ya que si se encuentra excesiva variabilidad, se debe corregir antes de continuar (Manual OIE, 2004).

La estandarización de la PCR para *H. parasuis* mostró un producto de 821 pb, el control negativo (agua DEPC) y el patrón de peso molecular; como se puede observar en la Figura 12.

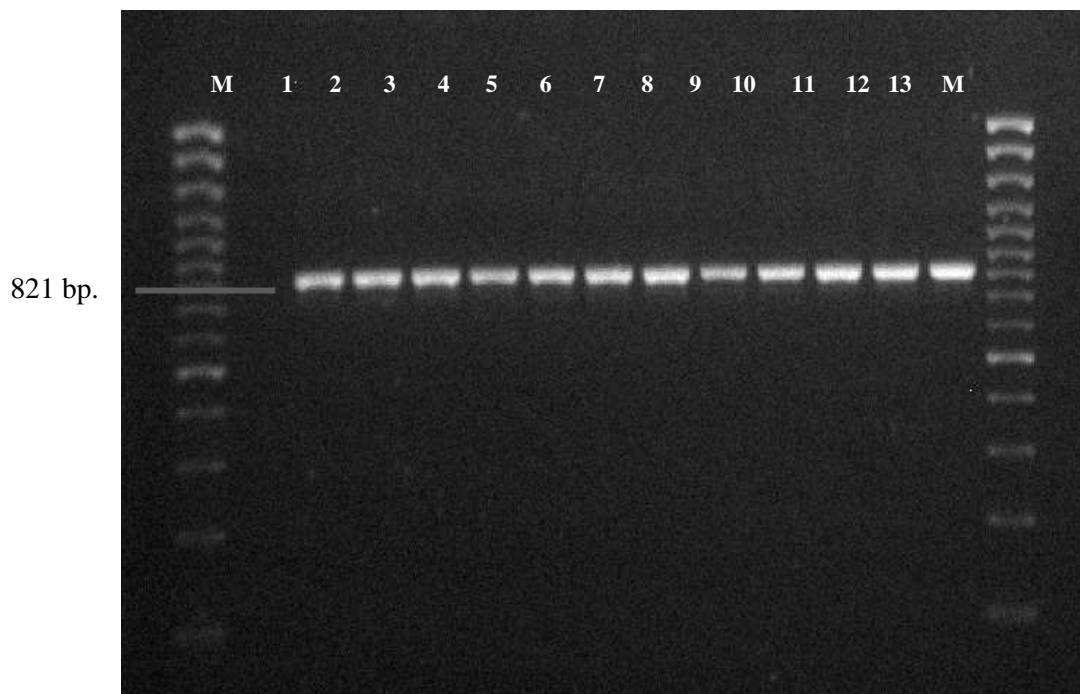


Figura 12. Fotografía de algunos resultados obtenidos en la prueba de PCR, donde se observan fragmentos de ADN de 821 pb de cultivos positivos de *H. parasuis* a partir de diferentes tipos de muestras. 1. Control negativo; 2. Control positivo; 3. 13565-00; 4. 13570; 5. 12916-00; 6. 10021-00; 7.8360-00; 8.5617-08; 9.6002; 10.1590-00; 11. 9859-00; 12. 12437-00; 13. 15799-00. M. Marcador peso molecular de 100 Kb (Promega).

2.4.4. TÉCNICA DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS INTERGÉNICAS DEL CONSENSO REPETITIVO DE LAS *Enterobacterias* (ERIC-PCR).

Para la tipificación de los perfiles genéticos del *H. parasuis*, se empleó la técnica ERIC-PCR, descrita por Versalovic y col, (1991) y Ruiz y col, (2001). Esta técnica utiliza un par de iniciadores: ERIC-1F y ERIC-2R (Tabla 18), a los cuales se les hizo un alineamiento pareado a las bases con el programa bioinformático de nucleótidos BLAST, para confirmar que esta pareja de iniciadores únicamente presentara alineamientos similares, con especies pertenecientes al grupo de la familia de las *Enterobacterias*.

Tabla 18. Iniciadores empleados en la normalización de la técnica de ERIC-PCR.

Nombre del iniciador	Secuencia (5' - 3')	Longitud (pb)
ERIC-1F	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	22
ERIC-2R	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	22

Aunque no es un procedimiento difícil, es preciso seguir atentamente los pasos indicados. Para el montaje de la ERIC-PCR, se empleó el ADN obtenido a partir de los cultivos positivos aislados por bacteriología, los cuales fueron confirmados por PCR, con la finalidad de que se obtuvieran resultados positivos específicamente para el *H. parasuis* y no estuviera presente el ADN de otra especie bacteriana.

Para la realización de este análisis genotípico, se incluyó como control positivo una cepa de *H. parasuis* Tipo II (Universidad Minnesota, Mogollón 1998) y 12 aislamientos de cultivos de *H. parasuis* positivos confirmados por bacteriología y PCR (Tabla 19). Estas muestras fueron extraídas por el método anteriormente mencionado.

Igualmente, se estimó inicialmente procesar por la prueba de ERIC, el cultivo bacteriológico de todas las muestras obtenidas en el estudio. Sin embargo, finalmente no se logró recuperar por bacteriología las 42 cepas obtenidas por PCR y por tal motivo solo se incluyeron 12 cultivos, a partir de los cuales se logró recuperar una cantidad de inóculo mayor a 1000 µl, necesaria para la estandarización de la técnica y las posteriores repeticiones del registro fotográfico.

Se trabajó con 25 µL para la mezcla madre de PCR, preparada con un tampón de PCR 1X (Promega, Catalog N°. M1865), 3 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) (Promega, Catalog N°. M1865), 0,3 mM de cada dNTP (ATP, GTP, CTP, TTP) (Promega, Catalog N°. U1240), 0,4 µM de cada iniciador: 1) ERIC-1R (5'-ATGT AAGCTCCTGGGATTAC-3') y 2) ERIC-2R (5'-AAGTAAGTGACTGGGGT GAGCG-3'), (Invitrogen, Estados Unidos), 0,04U/µL de la enzima ADN Polimerasa Go Taq Flexi (Promega, Catalog N°. M8295) y 3 µl de ADN de las muestras, para un volumen final de 25 µl por muestra. El flujograma del protocolo de la técnica de ERIC-PCR, se describe en el Anexo 11.

La amplificación se realizó en un termociclador (PERKIN ELMER GENEAMP PCR System 2400), en el cual se programaron los ciclos en las siguientes condiciones:

- **Denaturación Inicial:** 94°C por 5 minutos.
- **Seguida de 30 ciclos compuestos de:**
 - **Denaturación:** 94°C por 30 segundos.
 - **Anillamiento:** 40 °C por 2 minutos.
 - **Extensión:** 72°C por 2 minutos.
- **Extensión final:** 72°C por 5 minutos.
- **Infinito:** 4°C.

Algunas modificaciones realizadas en esta prueba por el investigador fueron: la cantidad de ADN extraído de las muestras del estudio se aumento de 1 a 4 μ l y la concentración usada de Taq polimerasa se disminuyo de 0.5U/ μ l a 0,03U/ μ l.

Tabla 19. Relación de productos de ADN de *H. parasuis*, analizados por la técnica de ERIC-PCR.

No. Orden	Procedencia geográfica del cultivo.		Código granja	Fecha de muestreo	Origen del tipo de Muestra
	Departamento	Municipio			
Control positivo	Universidad Minnesota (Mogollón, Agosto/30/1998)		00	Agosto - 1998	NR
1	Cundinamarca	Fúquene	52	Octubre - 2006	Hisopo articular.
2	Cundinamarca	Sopo	36	Octubre - 2006	Hisopo articular
3	Cundinamarca	Cogua	57	Octubre - 2006	Pulmón.
4	Cundinamarca	Ubaque	60	Septiembre - 2006	Pulmón.
5	Cundinamarca	Ubaque	60	Julio - 2006	Hisopo pericardico
6	Cundinamarca	La Mesa	45	Junio - 2006	Pulmón
7	Valle del Cauca.	Buga	77	Mayo - 2006	Hisopo pleural
8	Cundinamarca	Facatativá	59	Mayo - 2006	Líquido abdominal
9	Cundinamarca	La Calera	53	Febrero - 2007	Pulmón
10	Cundinamarca	Fómeque	46	Julio - 2006	Pulmón
11	Cundinamarca	Ubaté	29-2	Mayo - 2006	Pulmón
12	Boyacá	Samondoco	05	Diciembre - 2006	Hisopo pulmón

NR: No Reportado

2.4.4.1. Visualización de los patrones electroforético de ERIC-PCR.

Los productos de ERIC-PCR, se separaron electroforéticamente en un gel de Agarosa Tipo II (SIGMA, A6877), en una unidad horizontal de una sola dimensión. El cual se preparó al 2% p/v preparado en un tampón TBE 5X (89 mM de base Tris-acetato, 89 mM de ácido bórico, 2.4 mM de EDTA sodio a pH 8.3), teñidos en una solución con 2 µg/ml de bromuro de etidio (10 mg/ml Promega, Catalog N°. H5041).

Se dispense 2 μ l de tampón de carga (Invitrogen, Catalog N°. 10816-015) y 3 μ l de la totalidad del producto obtenido en la ERIC-PCR en el gel. Se utilizó un patrón de peso molecular de 1 Kb (Promega, Catalog N°. G5711), como marcador y se corrió con corriente continua de 70 voltios con una fuente de poder, por un período de 2 hora y 30 minutos.

Por otro lado, la imagen obtenida del gel con los perfiles genéticos de los aislamientos, fue fotografiado bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador BIORAD Universal Hood II (Estados Unidos). Se guardó digitalmente y se realizo una tablas de 0 y 1, con el patrón de huellas de cada muestra que luego se transcribió al formato Treecon. Posteriormente, se analizaron las relaciones genéticas observadas entre el patrón de huellas de cada muestra, con una matriz de similaridad siguiendo el algoritmo matemáticos de distancia genética de coancestría descrito por Reynolds y col, (1983) y Nei y Li, (1979); En: Li Wen-Hsiung (1981).

Posteriormente, la secuencia de datos obtenida se ingresó en el programa Treecon para Windows (1.3) (Van de Peer y De Wachter, 1993), y se estimó para cada uno de los perfiles genéticos, la distancia existente entre pares, empleando la matriz matemática del modelo de evolución de Kimura. A partir de esta matriz de similitud, se calculó la distancia existente entre los pares de cada caso con el método de agrupamiento de UPGMA, empleando promedios aritméticos y así construir finalmente un dendograma con las variables obtenidas. En estudios similares, el método de UPGMA, ha sido descrito como un método sencillo en la construcción de arboles o dendogramas a partir de un algoritmo matemático (Oliveira, 2007a).

Posteriormente se estimo el error del ensayo, con una prueba de bootstrap (porcentaje de que ocurra una ramificación en un nodo), con la finalidad de establecer la reproducibilidad y estabilidad del ensayo luego de efectuar 100 pseudoreplicas sobre la topología original del dendograma. Se partió de que, todas las biparticiones estuvieron altamente justificadas por los datos, según lo indicaron las proporciones de

bootstrap, donde solo se tuvieron en cuenta aquellos valores superiores al 50%. Se emplearon estos estimadores de distancia genética debido a que asumen la estructuración entre los grupos de cepas a partir de una derivación genética.

2.5. CONTROLES.

Durante todo el proceso fueron utilizados los siguientes controles:

- Control positivo: Se empleó durante los pasos de cultivo bacteriológico, extracción de ADN, PCR y ERIC-PCR, una cepa de *Haemophilus parasuis* Tipo I, obtenida de la Universidad de Minnesota, Estados Unidos (Mogollón, 1998).
- Control positivo: Se empleo durante los pasos de cultivo bacteriológico, una cepa de *Staphylococcus aureus* (Referencia No.12605), adquirida en la colección de cepas de la ATCC (American Type Culture Collection) (Estados Unidos), la cual se encuentra en el banco de cepas del Laboratorio de Bacteriología en el LNDV-ICA, de Bogotá.
- Control negativo: Se empleo durante las pruebas de biología molecular (PCR y ERIC-PCR), agua pura desionizada, tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

2.6. ANALISIS DE DATOS.

En este trabajo de investigación se analizó una población de 445 muestras de *H. parasuis* en granjas porcícolas colombianas. Los resultados de laboratorio, colectados según su origen geográfico, por departamento, municipio y granja en el transcurso de la investigación, se analizaron por estadística descriptiva según el tipo de muestra y técnica de diagnostico (Osorno y col, 1998).

Para establecer la concordancia entre las pruebas de cultivo bacteriológico y la prueba de PCR más allá del azar, se usó la prueba de Kappa de Cohen (Fleiss y Everitt, 1969). Se tomaron como valores negativos las muestras negativas y como valores positivos las muestras positivas.

La eficiencia diagnóstica del método de aislamiento bacteriológico y PCR, se analizó en base a los criterios de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo utilizando para su análisis el paquete estadístico Epi-Info versión 6.04 (Epi-Info, 2000) y PAST PROGRAM versión 1.53 (Hammer y col, 2001). Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

Adicionalmente, se realizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Daniel W, 1999), en la cual se determinó estadísticamente las diferencias significativas entre ambas pruebas. Esta prueba igualmente se empleó para determinar los valores de normalidad y de media encontrados en los diferentes tipos de muestras evaluados con respecto a la técnica de diagnóstico empleada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE LABORATORIO.

Los resultados de la presente investigación, son relevantes para los porcicultores y la comunidad científica local, debido a que están relacionados con una problemática sanitaria de importancia para la industria nacional.

Los criterios empleados en la selección de los animales, y las muestras empleadas en esta investigación, se caracterizaron por seguir los lineamientos implementados en las investigaciones seguidas por Oliveira y col, (2002, 2004a, 2004b) y Moser, (2005), en las cuales se describe las medidas más importantes para optimizar la recuperación de *H. parasuis*. De este modo, para el muestreo solo se incluyeron muestras que preferiblemente pertenecieran a cerdos sacrificados no tratados con antibióticos y que presentaran signos clínicos característicos de una infección aguda.

Para mejor la probabilidad de aislamiento en piaras donde se sospecha de *H. parasuis*, se colectaron muestras de animales que presentaron signos de enfermedad como: artritis, pleuritis, pericarditis, peritonitis, meningitis y poliserositis. También, se muestrearon animales con signos neurológicos, anorexia, articulaciones inflamadas, dificultad en la respiración, moco, aborto, cianosis y que idealmente presentaran tos, estados febriles y lesiones por neumonía al momento de la necropsia Moser, (2005).

Por otro lado, las necropsias efectuadas, a los animales en este estudio, se realizaron rápidamente, con el objetivo de disminuir los procesos de invasión de microorganismos contaminantes y los procesos autolíticos de lisis en los tejidos a analizar. Sin embargo, no fue posible fijar un tiempo máximo dentro del cual se practico la necropsia, ya que los tiempos en los que se presenta la descomposición varían mucho de acuerdo con la temperatura ambiente y la enfermedad que haya

afectado al animal. Por este motivo las muestras fueron refrigeradas inmediatamente después de su recolección y posteriormente procesadas en el laboratorio, de acuerdo a lo reportado por Oliveira, (2004b).

A partir del análisis de datos donde se implemento el muestreo en campo (Tabla 9), se pudo determinar que el tipo de explotación más afectado por *H. parasuis* fue en granjas de cría-precebo, ubicadas en los departamentos de Antioquia y Valle. Mientras, que en el departamento de Cundinamarca las explotaciones afectadas correspondieron en su mayoría a ciclo completo (Tabla 10). Por lo tanto, se consideró en esta investigación, que *Haemophilus parasuis*, puede llegar a afectar a los porcinos en cualquier etapa de producción, por tratarse de una bacteria reemergente y patógena, al igual que lo sugerido por Rapp-Gabrielson, (1999).

Así mismo, se pudo observar que los problemas clínicos más comúnmente encontrados en las granjas examinadas en campo, los signos clínicos se presentaron en su mayoría a nivel nervioso, respiratorios y articular, se presentaron entre la 3 y 9 semana de vida (Tabla 11). Estos resultados, confirman los resultados previamente reportados por MacInnes y col (1999), Oliveira y col, (2001), los cuales determinaron que los animales que se encuentran en la etapa de cría (4 a 6 semana), se consideran la población más susceptible de ser afectada por *H. parasuis*, presumiblemente porque la inmunidad materna del animal comienza a finalizar y los animales están más expuestos a la infección de campo. Sin embargo, no se pudo establecer comparaciones por regiones, municipios y granjas, debido al bajo porcentaje de muestras en algunos departamentos.

La selección de una muestra representativa para el análisis de *H. parasuis*, es esencial para un correcto diagnostico de la enfermedad. En esta investigación se incluyeron 25 tipos de muestras diferentes, las cuales se escogieron de acuerdo a ciertos parámetros propuestos por Oliveira y col (2002; 2004b). Por consiguiente, en esta investigación se incluyeron muestras como: pulmón, liquido cefalorraquídeo (LCR), líquido

ventricular, líquido articular, meninges, pericardio, pleura, exudado torácico y/o abdominal, ganglios preesternales y parabronquiales. (Tabla 14).

Las muestras de exudado fibrinoso se tomaron de la superficie mediante escobillones estériles. Mientras que los líquidos procedentes de articulaciones, peritoneo, pericardio y cavidad torácica se colectaron mediante una jeringa estéril, con la finalidad de prevenir la contaminación de la muestra y evitar la disminución de la viabilidad del microorganismo en el laboratorio (Oliveira, 2004b).

Así mismo, para la recuperación de muestras colectadas con hisopos, se tuvo en cuenta el tiempo de envío de las muestras, desde el momento de la toma de la muestra hasta su posterior procesamiento en el laboratorio. De esta manera cuando las muestras fueron enviadas y procesadas en un periodo de tiempo mayor a 24 horas, se emplearon hisopos con medio Amies suplementado con carbono, mientras que cuando las muestras se enviaron y procesaron en un tiempo menor a 24 horas, se emplearon hisopos de algodón.

Los muestreos realizados con este tipo de hisopos, se implementaron en la investigación de acuerdo a lo reportado por Moser, (2005); Del Río y col, (2003); Oliveira y col, (2004a; 2004b), los cuales recomiendan el empleo de los hisopos con medio Amies, debido a que optimizan la viabilidad y recuperación de *H. parasuis*, por la acción de un suplemento compuesto por una solución de sales de fosfato. Igualmente, los hisopos fueron enviados en el menor tiempo posible en condiciones de refrigeración, al igual que lo sugerido por los anteriores autores con la finalidad de incrementar la probabilidad de aislamiento de *H. parasuis*, debido a que se trata de un microorganismo termo sensible y su tasa de supervivencia se ve disminuida por la flora acompañante presente en los tejidos del animal, al momento de la eutanasia. Igualmente, se incluyeron muestras de pulmón, bazo e hígado teniendo en cuenta que el hisopado de órganos puede ser menos productivo debido a que la viabilidad del microorganismo disminuye por la competencia con la flora microbiana (Moser,

2005). No obstante, los hisopos tienen la ventaja de manipularse y transportarse fácilmente en comparación con las muestras de tejidos completos (Oliveira, 2001).

En esta investigación se consideró que la procedencia geográfica de las muestras analizadas influyó de cierta manera en los resultados obtenidos. En el departamento donde se observó el mayor número de muestras fue en Cundinamarca (298 muestras), posiblemente debido a la proximidad con el laboratorio de diagnóstico veterinario ICA-CEISA. Mientras que en las muestras remitidas del Tolima, Santander, Quindío y Cesar, no se obtuvieron muestras positivas por ninguna de las dos técnicas empleadas, lo cual podría deberse a la baja proporción de supervivencia del microorganismo asociado a factores tales como: el tiempo vs la distancia en el procesamiento de las muestras, al posible tratamiento parenteral previo al muestreo, la procedían de cadáveres con más de 24 horas de muerte y finalmente porque se remitieron muestras que presentaban signos o lesiones similares a las producidas por *H. parasuis*, pero los animales estaban infectados por otros agentes como *Streptococcus suis* o *Actinobacillus suis* que producen un cuadro sistémico similar.

3.2. ANÁLISIS BACTERIOLOGICO.

De los 93 casos colectados, se analizaron 445 muestras a partir de los cuales se obtuvo por cultivo bacteriológico, 33 (7.41%) cepas positivas de *H. parasuis*, que fueron colectadas en 22 municipios y 27 granjas, ubicadas en los departamentos de Cundinamarca, Valle del Cauca, Meta, Antioquia y Boyacá (Tabla 20). Las colonias, se caracterizaron por presentar a nivel microscópico, una morfología de bacilos gram negativos y a nivel macroscópico colonias transparentes y puntiformes en agar sangre, con satelitismo de *S. aureus*. Estas colonias se confirmaron como pertenecientes al género *H. parasuis*, luego de realizar una determinación bioquímica específica, frente a otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*, de acuerdo a investigaciones previas seguidas por, Møller y col (1990); Kielstein y col, (2001) y Oliveira y col, (2004a).

Las colonias se caracterizaron por ser catalasa positivas, indicando la producción de la enzima que les permite catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua, permitiendo identificarlas rápidamente dentro del grupo de bacterias Gram negativas, como *H. parasuis*. Mostraron producción de ácido en glucosa y maltosa, debido a la fermentación de estos azúcares como fuente de carbono. Sin embargo no acidificaron trealosa, inulina, esculina, lactosa ni manitol. En cuanto a la prueba de urea, las colonias no produjeron viraje del medio, debido a la ausencia de la enzima ureasa, encargada de la hidrólisis de la urea. Sin embargo, estas pruebas bioquímicas, toman demasiado tiempo para confirmar la etiología del agente involucrado (Oliveira y col, 2001), por lo tanto, se recurrió en este trabajo a complementar estas pruebas bioquímicas con pruebas moleculares, con la finalidad de optimizar el diagnóstico de *H. parasuis*.

En cuanto al análisis de resultados de bacteriología, según el tipo de muestra colectado, se observó que en 10 de las 25 muestras analizadas, el tejido donde se consiguió una mayor recuperación del microorganismo fue a partir de pulmón con 14 muestras positivas de 89 analizadas. Sin embargo, proporcionalmente, la mayor recuperación del patógeno, se obtuvo a partir de hisopo pericardico, líquido torácico, tejido de pulmón, hisopo abdominal e hisopo de pulmón (Tabla 21). Respectivamente, se observó una baja proporción de recuperación en hisopo de tórax, tejido pericardico, líquido pericardico, líquido abdominal e hisopo de encéfalo.

Según Calsamiglia y col, (1999), la fácil detección de *H. parasuis* en una muestra, se relaciona con un número elevado del microorganismo y con el predominio principal del mismo dentro de la microflora concomitante. Por otro lado, se ha reportado que la presencia de coinfección entre *H. parasuis* con otros patógenos como el virus de la Pseudorabia (PRV) o Aujeszky, puede ocasionar destrucción de células epiteliales respiratorias y de esta manera favorecer la proliferación de *H. parasuis* en los pulmones del cerdo (Narita y col, 1994; Oliveira y col, 2004a).

Tabla 21. Proporción de muestras positivas de *H. parasuis*, por la técnica de cultivo bacteriológico.

Tipo de muestra analizado.		Total de muestras analizadas	Muestras positivas por cultivo bacteriológico	% Positivos
1	Hisopo pericardico	10	2	20,0
2	Liquido torácico	21	4	19,0
3	Tejido de pulmón	89	14	15,7
4	Hisopo abdominal	15	2	13,3
5	Hisopo pulmón	23	3	13,0
6	Hisopo de tórax	11	1	9,1
7	Tejido pericardico	11	1	9,1
8	Liquido pericardico	30	2	6,7
9	Liquido abdominal	47	3	6,4
10	Hisopo encéfalo	26	1	3,8
11	Meninges	12	0	0,0
12	Tejido de encéfalo	21	0	0,0
13	Ganglios	23	0	0,0
14	Hisopo articular	6	0	0,0
15	Liquido articular	15	0	0,0
16	Liquido ventricular	10	0	0,0
17	Hisopo ventricular	3	0	0,0
18	Hisopo bronquial	4	0	0,0
19	Bazo	6	0	0,0
20	Hígado	5	0	0,0
21	Hisopo nasal	5	0	0,0
22	Hisopo de LCR	8	0	0,0
23	LCR	34	0	0,0
24	Tonsila	7	0	0,0
25	Hisopo Pleural	3	0	0,0
TOTAL	25	445	33	7.4

En pulmón, corazón y líquido ventricular se ha reportado buenos resultados en el aislamiento de el *H. parasuis* (Moser y col, 2005), cuando se envía todo el órgano o una buena parte de él para análisis en el laboratorio. No obstante, en el presente trabajo no se consiguió el aislamiento del microorganismo en la proporción deseada en estos tejidos, probablemente debido a que se recibieron pequeñas cantidades de la muestra o porque fueron sometidas a un proceso de manipulación y contaminación al momento del muestreo.

La baja recuperación en estas muestras se pudo deber a una incorrecta selección de los animales a muestrear y el tipo de lesión que presentaban. Por este motivo, es muy importante realizar un adecuado diagnóstico de campo, partiendo de una correcta diferenciación de una lesión crónica Vs una aguda, en un animal que se presume está infectado por *H. parasuis*, ya que la recuperación y aislamiento de este agente infeccioso es más adecuado a partir de animales afectados crónicamente (Oliveira, 2004b). Según Pijoan y col, (2002), es poco probable reportar un aislamiento negativo de *H. parasuis* a partir de una lesión clásica y en este caso debe sospecharse de un diagnóstico clínico realizado incorrectamente o más probablemente cuando se trata de animales que han sido tratados con antibióticos parenterales. Es probable que el bajo éxito obtenido en el aislamiento del microorganismo a partir de hisopo articular, hisopo de LCR, hisopo pleural, líquido articular, líquido ventricular, hisopo ventricular, hisopo bronquial, meninges, bazo, hígado, hisopo nasal, LCR, tonsila, tejido de encéfalo y ganglios este asociado a estas causas.

Igualmente, se consideró que otro factor limitante en la recuperación del *H. parasuis*, por cultivo bacteriológico fue el transporte de las muestras, ya que un cambio drástico en la temperatura de mantenimiento del *H. parasuis* es crítico para la supervivencia del microorganismo.

En un estudio *In vitro* efectuado con cultivos de tejido nasal y de tráquea, se demostró que las cepas patógenas de *H. parasuis*, tienen mayor nivel de invasión y movilidad

en células endoteliales, que las cepas no patógenas (Morris y col, 2006). Esto sumado al hecho de un posible proceso de coinfección, puede explicar la hipótesis por la cual no se logró recuperar el microorganismo a partir de hisopados nasales por la técnica de cultivo bacteriológico. No obstante, el *H. parasuis* es considerado como un organismo comensal del tracto respiratorio superior y puede ser aislado del tracto a partir muestras de la cavidad nasal, tonsilas y tráquea de animales sanos y por este motivo el aislamiento de estas cepas no patógenas, no tiene significado clínico (Oliveira, 2004b).

Se observó que las muestras que presentaron más bacterias contaminantes, fueron, pulmón, hisopo de pulmón, hisopo bronquial y tonsila. Se detectaron microorganismos usualmente encontrados en muestras procedentes del tracto respiratorio porcinos como: *A. indolicus*, *A. porcinus*, *A. minor*, otros Actinobacilos y *Streptococcus suis*. También se aislaron bacterias contaminantes procedentes del medio ambiente o flora nativa del animal como: *Proteus spp*, *Citrobacter spp*, algunos hongos y levaduras y por PCR, se detecto *Mycoplasma pleuropneumoniae*.

3.2.1. Análisis de susceptibilidad antimicrobiano.

El análisis de susceptibilidad antimicrobiano se implementó a 9 de los 33 aislamientos positivos, obtenidos por bacteriología. Se colectaron por muestreo en laboratorio, siete casos procedentes de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá y los dos casos restantes fueron muestreados en campo, en los departamentos de Antioquia y Valle del Cauca (Tabla 22).

Luego de analizar los resultados, se estimó que el bajo número de muestras analizadas, se puede atribuir a la baja viabilidad del microorganismo, al momento de cultivarlo en el análisis de susceptibilidad antimicrobiano. Esta misma observación fue descrita por Oliveira y col, (2001); Moser, (2005) y Olvera A, (2006b), los cuales observaron que el *H. parasuis*, fuera del huésped, se torna en un microorganismo

fastidioso, frágil, de baja viabilidad frente a patógenos de rápido crecimiento y microorganismos contaminantes y con un tiempo de vida corto cuando se cultiva en medios microbiológicos, especialmente cuando es recuperado a partir de animales con un tratamiento previo con antibióticos. Debido a estas razones, en esta investigación se estimó que la recuperación del *H. parasuis* en una cantidad adecuada para el análisis antimicrobiano pudo verse comprometida.

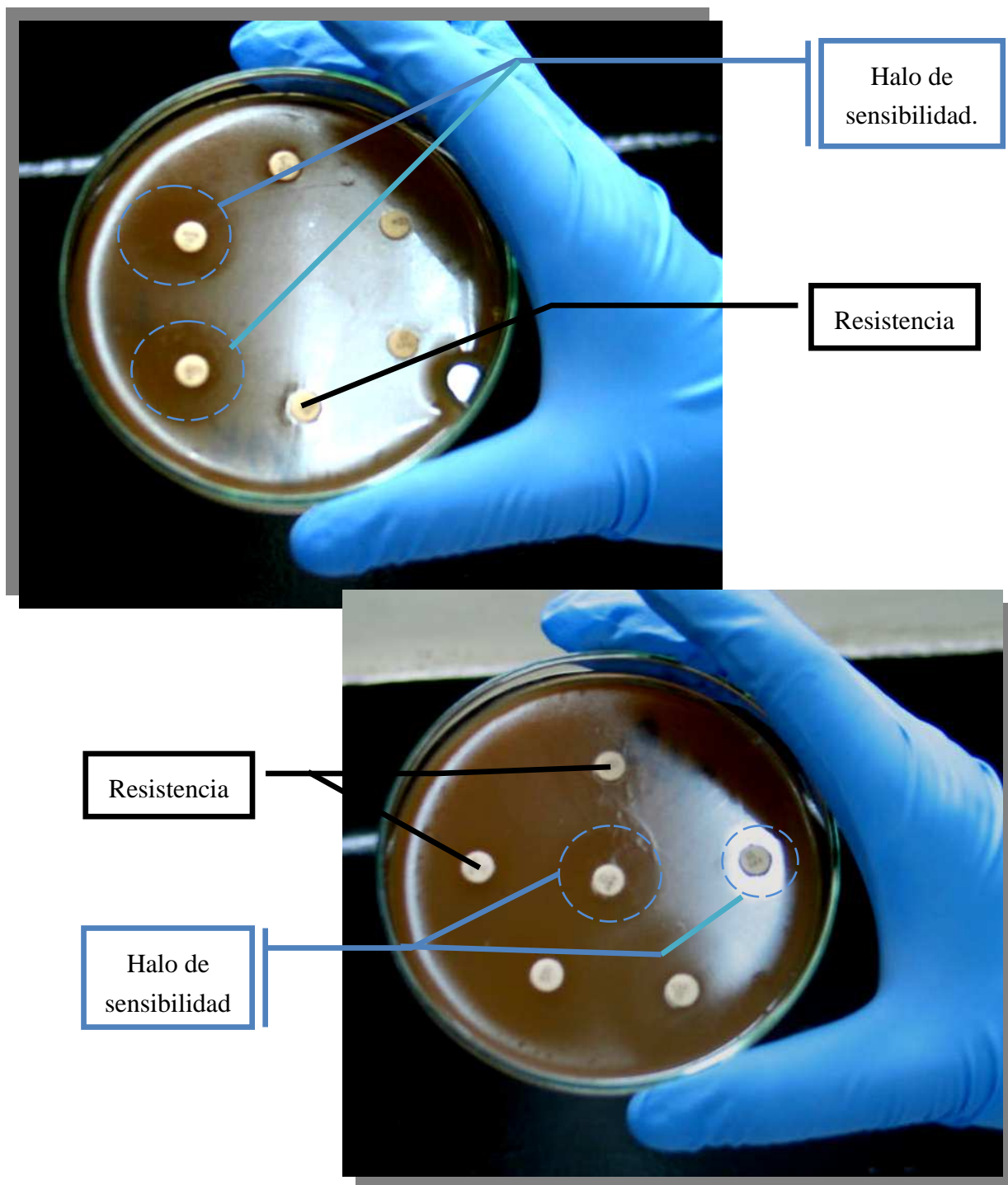
Tabla 22. Relación de las muestras analizadas por la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, según la procedencia geográfica y el tipo de muestreo.

PROCEDENCIA GEOGRAFICA			Tipo de muestreo	RESULTADOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	
DEPARTAMENTO	Municipio	Granja		SENSIBLE	RESISTENTE
BOYACA	Samondoco	05	Laboratorio	N, FFC, SXT, AMP, ENR, K, TE, CIP, NOR, OT.	FOS, C, FUR, COL, AMX, MY, CAZ, CN, AK, FOX.
CUNDINAMARCA	Facatativa	59		K, AMP, AMX, CAZ.	SXT, MY, NOR, C, FUR, ENR, TE, CIP, OT, N, COL, FOS, AK, FFC, FOX, CN
	Ubate	30		C, FOS, AMX, MY, OT, CIP, COL, K, NOR,	FFC, FUR, ENR, TE, CAZ, AMP, AK, N, SXT, CN, FOX.
		31		FOX, NOR, MY	K, ENR, FUR, C, FFC, CAZ, OT, AMX, FOS, TE, CIP, AMP, COL, SXT, AK, CN, N.
	La Calera	53		CN, NOR, AMP, N, OT	SXT, C, FUR, FOS, MY, ENR, FOX, COL, K, CAZ, AMX, CIP, TE, AK, FFC.
	Cogua	57		AK, FUR, CAZ, ENR, NOR, OT, FOS, K.	COL, TE, MY, AMP, C, AMX, FFC, CIP, N, SXT, CN, FOX
Guaduas	35	AK, AMX, AMP, SXT, FFC, ENR, K, TE, CIP, CAZ.		FUR, FOS, NOR, N, OT, C, MY, CN, FOX, COL.	
ANTIOQUIA	La ceja	02	Campo	NOR, AMX, FOS, ENR, TE	K, FUR, COL, FFC, SXT, CAZ, OT, C, MY, CIP, AMP, AK, N, FOX, CN
VALLE	Cartago	76-7		NOR, AMX, FOS, ENR, AK.	K, FUR, N, C, FFC, SXT, CAZ, OT, COL, MY, FOX, TE, CIP, AMP, CN

Abreviaciones: Norfloxacin (NOR), Amoxicilina (AMX/AML), Enrofloxacin (ENR), Kanamicina (K), Ampicilina (AMP), Fosfomicina (FOS), Oxitetraciclina (OT), Tetraciclina (TE), Ciprofloxacina (CIP), Amikacina (AK), Cefotazidina (CAZ), Florfenicol (FFC), Neomicina (N), Trimetoprim/Sulfa (SXT), Lincomicina (MY), Gentamicina (CN), Cefoxitina (FOX), Cloranfenicol (C), Cefiofuro (FUR), Colisina (COL).

El aislamiento de *H. parasuis*, es muy importante, ya que permite realizar futuros estudios de sensibilidad antimicrobiana o tipificación, los cuales son de utilidad para el control de la enfermedad en el campo (Olvera A, 2006b). En la figura 13, se ilustra uno de los resultados del antibiograma, obtenido a partir de un cultivo de *H. parasuis*.

Figura 13. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana, aplicada a un cultivo de *Haemophilus parasuis*.



En este estudio se evaluaron 20 antibióticos específicos para el género *Haemophilus spp*, dentro de los cuales, la mayor susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* en las cepas analizadas se encontró en, Norfloxacin con un 77.8%, seguido de Amoxicilina, Enrofloxacin y Kanamicina con un 55.6%, Ampicilina, Fosfomicina y Oxitetraciclina con un 44.4% y frente a Tetraciclina, Ciprofloxacina, Amikacina y Ceftazidina fue del 33.3% (Tabla 23).

Tabla 23. Relación de resultados de sensibilidad y resistencia antimicrobiana en aislamientos de *H. parasuis*, frente a los 20 antibióticos evaluados en el transcurso de la investigación.

Nombre del antibiótico	Abreviatura	Sensibilidad	Resistencia	Total	% Sensibilidad	% Resistencia
Norfloxacin	NOR	7	2	9	77,8	22,2
Amoxicilina	AMX/AML	5	4	9	55,6	44,4
Enrofloxacin	ENR	5	4	9	55,6	44,4
Kanamicina	K	5	4	9	55,6	44,4
Ampicilina	AMP	4	5	9	44,4	55,6
Fosfomicina	FOS	4	5	9	44,4	55,6
Oxitetraciclina	OT	4	5	9	44,4	55,6
Tetraciclina	TE	3	6	9	33,3	66,7
Ciprofloxacina	CIP	3	6	9	33,3	66,7
Amikacina	AK	3	6	9	33,3	66,7
Ceftazidina	CAZ	3	6	9	33,3	66,7
Florfenicol	FFC	2	7	9	22,2	77,8
Neomicina	N	2	7	9	22,2	77,8
Trimetoprim sulfametoxazol	SXT	2	7	9	22,2	77,8
Lincomicina	MY	2	7	9	22,2	77,8
Gentamicina	CN	1	8	9	11,1	88,9
Cefoxitin	FOX	1	8	9	11,1	88,9
Cloranfenicol	C	1	8	9	11,1	88,9
Cefiofure	FUR	1	8	9	11,1	88,9
Colisina	COL	1	8	9	11,1	88,9

En este estudio, la mayor proporción de susceptibilidad se observó frente a Norfloxacina (fluoroquinolona). Un antibiótico de segunda generación derivado de la penicilina, usualmente empleado en infecciones causadas por bacterias gram negativas y comúnmente empleado en medicina de porcinos, para el tratamiento de infecciones respiratorias comunes como la neumonía enzoótica (Díaz D, 2001). Igualmente, este antibiótico se caracteriza por presentar una excelente actividad *in vitro* contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus spp.*

Los resultados de susceptibilidad, obtenidos con la norfloxacina y enrofloxacin (fluoroquinolonas) y en la amoxicilina (derivado semi-sintético de la penicilina), son comparables con los reportes hallados en Suiza, por Wissing y col, (2001), en los cuales se encontró, por la técnica de difusión en disco, una alta susceptibilidad a la penicilina y a la enrofloxacin. Resultados similares se hallaron en un estudio, realizado en Inglaterra y España, donde se evidenció mayor susceptibilidad frente a la penicilina, ceftiofur, eritromicina, tilmicosin y enrofloxacin en Inglaterra, en comparación con los resultados hallados en España, en donde no se observó sensibilidad frente a estos antimicrobianos (De la Fuente y col, 2007).

La alta sensibilidad observada con la Kanamicina (amino glucósido), fue muy particular, debido a que a la fecha no hay descritos reportes de susceptibilidad frente a este antibiótico en aislamientos de *H. parasuis*. No obstante, en un estudio realizado en Suiza, se reportó resistencia a la Kanamicina en el 50% de los 32 aislamientos de *H. parasuis* (Wissing y col, 2001).

Igualmente, se apreció que la ampicilina, la fosfomicina y la oxitetraciclina exhibieron una sensibilidad de 44.4% y la tetraciclina, la ciprofloxacina, la amikacina y el ceftazidim una sensibilidad de 33.3% respectivamente (Figura 14). Estos resultados contrastan con el estudio realizado en Estados Unidos de América, por MacInnes y col (1999), en el cual consideraron a la ampicilina y a la tetraciclina,

como el tratamiento parenteral más recomendado, en el tratamiento de *H. parasuis*, debido a que obtuvieron una susceptibilidad mayor del 90%.

Los resultados observados frente a Gentamicina, Cefoxitin, Cloranfenicol, Ceftiofure y Colisina, con una susceptibilidad de 11.1%, contrastan con los resultados hallados por Rapp-Gabrielson, en un estudio en Estados Unidos de América en unos aislamientos en los cuales obtuvo una susceptibilidad mayor al 90%. Mientras, que frente a estos mismos antibióticos se apreció una resistencia de los aislados de 88,9%, en donde cabe destacar que la resistencia frente a la Gentamicina en este estudio fue similar la observada en un estudio de Wissing y col, (2001).

En este estudio el Florfenicol, exhibió una resistencia de 77,8%, resultados similares fueron reportados por Aerstrup y col (2004), en un estudio llevado a cabo en Dinamarca, donde encontraron una alta resistencia frente a este antibiótico. Igualmente, De la Fuente y col (2007), describieron que este antibiótico fue usado por primera vez en el 2000, en el Reino unido y España. Sin embargo en estos dos países este tratamiento es muy empleado con prudencia en el tratamiento de *H. parasuis*, con el fin de evitar una resistencia emergente a este compuesto, puesto que desde entonces, la resistencia se ha incrementado considerablemente en estos países.

Igualmente, en este estudio se observó una resistencia de 77,8% frente a Neomicina, Lincomycina y Trimetropim-Sulfametoxazol (sulfonamida). A partir de estos resultados se pudo apreciar que resultados similares fueron reportados previamente por Wissing y col (2001), quienes determinaron una alta resistencia frente a las sulfonamidas. De la misma manera, en aislados españoles se encontraron aislamientos resistentes a la combinación de Trimetropin-Sulfametoxazol (De la Fuente y col, 2007). No obstante, en un estudio llevado a cabo en Dinamarca, se encontró una resistencia muy baja de 3% en los aislamientos, enfrentados a la combinación de Trimetropin-Sulfametoxazol (Aarestrup y col, 2004). Por lo tanto es factible suponer que la alta resistencia observada en el presente estudio, frente a

Neomicina, Lincomycina y Trimetropim-Sulfametoxazol, se debe probablemente al uso descontrolado de estos antibióticos en las explotaciones porcinas incluidas en el trabajo.

Los resultados de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos en este estudio, alcanzaron un porcentaje máximo de 77.8 %, en comparación con el porcentaje esperado superior al 90%. Por lo tanto, se determinó que la susceptibilidad antimicrobiana expresada por los aislamientos de *H. parasuis* en este estudio fue baja y se requiere de análisis posteriores, en los cuales se deberá de incluir un mayor número de muestras a evaluar. Resultados similares fueron reportados por De la Fuente y col (2007), en cepas españolas, concluyéndose que el tratamiento y la prevención de las infecciones producidas por *H. parasuis* se realiza de manera poco racional y controlada y en la mayoría de los casos se procede sin un análisis previo de efectividad antimicrobiana.

Según Costerton y col, (1999) y Fux y col, (2005), los consorcios microbianos pueden proveer resistencia antimicrobiana a los aislados, motivo por el cual se estima que *H. parasuis*, en su capacidad de producir biopelículas, logra generar una mayor resistencia a los antimicrobianos y causar una mayor infección a nivel sistémico. Este supuesto lo confirmaron en sus estudios Kaplan y col, (2005) y Martínez y col, (2006), quienes demostraron que *H. parasuis* es capaz de formar biofilms o biopelículas en medio de cultivo sólido, propiedad que pierde después de uno o dos pasajes *In Vitro*. Los biofilms, están conformadas por una matriz polisacárida, que secreta enzimas responsables de la resistencia a ciertos antibióticos y se le considera un factor importante en la colonización, virulencia y transmisión del agente. Por lo tanto, se estimó que la alta resistencia antimicrobiana observada en esta investigación, se puede llegar a atribuir a este proceso biológico.

Es posible que la susceptibilidad y resistencia de *H. parasuis* frente a los antimicrobianos varíe de una región a otra dependiendo de las estrategias de control aplicadas en las granjas. Por lo tanto es necesario realizar estudios regionales más amplios que permitan determinar el comportamiento antimicrobiano de los aislados circulantes.

3.3. ANÁLISIS MOLECULAR.

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es usada rutinariamente en la actualidad en la detección de *H. parasuis*, a partir de diferentes muestras clínicas en animales infectados (Oliveira y col, 2001; Harmon K, 2004). Esta prueba de PCR, ofrece mayor sensibilidad y especificidad en la detección del ADN de *H. parasuis*, principalmente cuando el diagnóstico no se puede confirmar por cultivo y se requiere un pronto y efectivo resultado.

En cuanto al procedimiento de extracción, se empleó el método de extracción de ADN con Proteínasa K, empleado con éxito en la extracción de ADN bacteriano (Lo y col, 1998; Oliveira y col, 2001; Kwonil y col, 2004 y San Millan y col, 2007). La extracción de ADN de *H. parasuis*, con Proteínasa K seguida de fenol-cloroformo y una precipitación alcohólica aportó buenos resultados para la obtención de ADN libre de proteínas y ARN en los estudios reportados por Verdugo y col, (2003); Kwonil y col, (2004) y Sahagún-Ruiz y col, (2006).

Mediante esta metodología, se obtuvo una buena concentración y purificación del ADN de *H. parasuis* presente en las muestras. Se escogió este proceso de extracción, por tratarse de tejidos y líquidos internos, donde se estima que no hay gran cantidad de inhibidores y por lo tanto no tienen que someterse a procesos agresivos. Igualmente, este método demostró ser eficaz en la eliminación de inhibidores a pesar de que el proceso tomó varias horas.

Bajo las condiciones de laboratorio donde se realizó el estudio, la actividad de la Proteínasa K para generar los protoplastos de *H. parasuis*, fue mejor a una temperatura de 55°C. De otro lado, la precipitación del ADN, fue más eficiente en la mezcla del ADN con el etanol absoluto a -70°C y finalmente la temperatura óptima para disolver el ADN en el agua DEPC fue de 66°C.

El uso de estos reactivos en el protocolo de extracción en esta investigación, permitió que las muestras colectadas, presentaran una concentración adecuada de ADN de *H. parasuis* y se conservara la integridad del mismo. No obstante, debido a la densidad de este protocolo y a la alta utilización de agentes tóxicos, tales como el fenol-cloroformo, algunos autores recomiendan el uso de kits comerciales de extracción de ADN.

3.3.1. Prueba de Sensibilidad de la PCR para *H. parasuis*.

La normalización de la técnica de PCR para el diagnóstico y detección de *H. parasuis*, se implementó en este trabajo de acuerdo a la investigación seguida por Oliveira y col, (2001). Esta técnica puede ser usada en diversidad de muestras como cultivos bacteriológicos y muestras clínicas (tejidos, hisopos y líquidos), procedentes de animales que presentaron síntomas característicos a los producidos por *H. parasuis*.

La prueba de sensibilidad se realizó con un cultivo bacteriológico de *H. parasuis*, con una absorbancia a 260 nm de 10,426 nm, la cual corresponde a una concentración inicial de ADN de 507 ng/μl (2×10^8 UFC/ml⁻¹), equivalente al tubo No 0.5 de la escala de Mac-Farland. Se realizaron diluciones seriadas de 1:5 y se obtuvieron bandas específicas dentro del rango de □ hasta 1/78125, estableciéndose así un límite de detección de ADN del patógeno de hasta 64 fg, (Figura 14).

Resultados similares fueron reportados por Oliveira y col (2001), quienes concluyeron que la prueba de PCR empleada en el diagnóstico de *H. parasuis*, fue altamente sensible, luego de que lograron detectar una cantidad mínima de ADN del patógeno de 69 pg, a partir de un cultivo puro con una concentración en un rango de 10^9 a 10^4 UFC/ml y una absorbancia aproximada de 13,8 nm. Igualmente, Sahagún-Ruiz y col, (2006), en su investigación, demostraron que la PCR para *H. parasuis* fue altamente sensible, ya que en los ensayos de sensibilidad lograron detectar 10 fg de ADN a partir de un cultivo de 6.3×10^3 UFC/ml.

Diluciones de ADN. 1:5 = 507 ng/ μ l

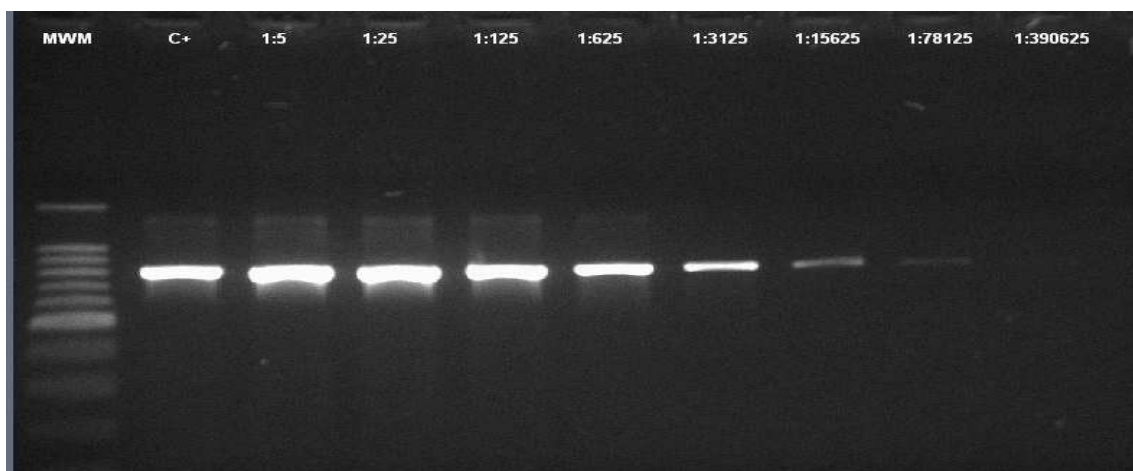


Figura 14. Límite de sensibilidad de PCR empleando diluciones seriadas de ADN del control positivo de *H. parasuis*. M. Marcador de peso molecular; C+. Control Positivo. Diluciones seriadas: Tubo 1. $1/5$ ó 5^{-1} , Tubo 2. $1/25$ ó 5^{-2} , Tubo 3. $1/125$ ó 5^{-3} , Tubo 4. $1/625$ ó 5^{-4} , Tubo 5. $1/3125$ ó 5^{-5} , Tubo 6. $1/15625$ ó 5^{-6} , Tubo 7. $1/78125$ ó 5^{-7} y Tubo 8. $1/390625$ ó 5^{-8} .

3.3.2. Prueba de Especificidad de la PCR para *H. parasuis*.

El blanco de amplificación del *H. parasuis*, fue el gen 16S y en el análisis no se observó amplificación cruzada con el *Staphylococcus aureus*, empleado para el crecimiento de *H. parasuis* por satelitismo y otros posibles microorganismos contaminantes en las muestras.

La prueba de PCR, permitió la amplificación de un producto de 821 pb, tanto en el control positivo como en cuatro cepas positivas de *H. parasuis* tomadas al azar. Igualmente, la prueba de PCR fue negativa para 7 especies bacterianas donde se incluyó, *Actinonobacillus pleuromoniae* (APP), *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma spp*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp* (Figura 15). Lo cual demostró que la prueba de susceptibilidad es altamente especie-específica para el microorganismo en estudio ya que no amplifica el ADN de otras especies, pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*, que puedan llegar a estar presentes en las muestras.

Sin embargo, Oliveira y col (2001), reportaron en su investigación, la presencia de una banda débil en la prueba de especificidad, luego de realizar la prueba de PCR, usando ADN extraído a partir de un cultivo puro de *A. indolicus* con una concentración de 10^9 UFC/ml. Bacterias como el *A. indolicus*, *A. porcinus* y *A. minor*, son especies normalmente encontradas en el tracto respiratorio superior de los porcinos, que normalmente pueden generar resultados positivos y se deben tener en cuenta en la interpretación de la prueba (Oliveira y col, 2001).

Por otro lado, Angen y col, (2007), determinaron en su trabajo que esta prueba de PCR fue 100% específica al momento de evaluarse con estas especies normalmente encontradas en el tracto respiratorio.



Figura 15. Limite de especificidad de la PCR de *H. parasuis*. M. Marcador molecular 100 Kb; **1.** Control positivo; **2.** Hps 13570; **3.** Hps 12916-00; **4.** Hps 10021-00; **5.** Hps 13565-00; **6.** Control negativo; **7.** *A. pleuropneumoniae*; **8.** *P. multocida*; **9.** *S. suis*; **10.** *S. aureus*; **11.** *Micoplasma spp*, **12.** *E. coli* y **13.** *Salmonella spp*.

Por lo tanto, la comparación y transferencia de una prueba de PCR entre laboratorios, se debe realizar cuidadosamente, para no incurrir en falsos positivos (Angen y col, 2007). En esta investigación se logró obtener resultados altamente especie-específicos y por consiguiente se estima que las condiciones y tiempos empleados en la estandarización de esta prueba fueron los más apropiados en la detección de *H. parasuis*, a partir de muestras clínicas, a pesar de la presencia de especies similares y flora contaminante.

3.3.3. Resultados de la prueba de PCR para *H. parasuis*.

La técnica de PCR detectó un segmento del genoma de *Haemophilus parasuis*, de un tamaño de 821 pares de bases, considerado como un resultado positivo, e indicador de la presencia del microorganismo en las muestras examinadas.

El empleo de esta técnica, puede llegar a ser considerado como un sustituto de las pruebas bioquímicas con lo cual se logra reducir considerablemente tiempo y trabajo en el diagnóstico de las infecciones por *H. parasuis* (Oliveira y col, 2001). Por este motivo en los últimos años se ha demostrado la utilidad del análisis de secuencias de la región del gen 16S rRNA de *H. parasuis*, para la realización de estudios de epidemiología molecular y por lo tanto se aplicó esta PCR con iniciadores dirigidos a esta región particular del genoma de este microorganismo.

De los 93 casos colectados, se analizaron 445 muestras a partir de los cuales se detectó por la técnica de PCR, 42 (9.4%) cepas positivas de *H. parasuis*, que fueron colectadas en 23 municipio y 29 granjas, ubicadas en los departamentos de Cundinamarca, Valle del Cauca, Meta, Antioquia y Boyacá (Tabla 24).

En cuanto al análisis de resultados según el tipo de muestra colectado, se obtuvo resultados positivos en 13 de las 25 muestras analizadas, el tejido donde se consiguió una mayor recuperación del microorganismo fue a partir pulmón, líquido abdominal, líquido pericardico e hisopo de encéfalo. Sin embargo, proporcionalmente, la mayor recuperación del patógeno, se obtuvo a partir de hisopo articular, hisopo abdominal, líquido torácico e hisopo pleural (Tabla 25). Respectivamente, se observó una baja proporción de recuperación en meninges, encéfalo, ganglios, líquido articular, líquido e hisopo ventricular, hisopo bronquial, bazo, hígado, hisopo nasal, LCR y tonsila.

En el análisis de resultados, no se evidenciaron diferencias mayores en los resultados de PCR obtenidos directamente de tejidos, hisopos y líquidos. Resultados similares fueron reportados por Oliveira y col, (2001), quien no encontró diferencias significativas en los resultados de PCR obtenido a partir del ADN de hisopos y tejidos colectados de animales naturalmente infectados. Motivo por el cual se determinó que cualquier tejido obtenido de un animal afectado se puede emplear de manera satisfactoria para el diagnóstico de *H. parasuis* por la técnica de PCR. No obstante hay que considerar que las muestras procedentes de hisopados permite un muestreo más representativo de la cavidad torácica en comparación del uso de pequeños fragmentos de pulmón. Según, Oliveira y col, (2001), con el empleo de un solo hisopo se puede muestrear diferentes áreas del peritoneo o cavidad torácica y así obtener mejores resultados de PCR dentro de un mismo animal.

Por otro lado, la baja detección del DNA observado por la técnica de PCR, se estimó que puede asociarse al procedimiento de extracción del ácido nucleico tradicional empleado, ya que no alcanza a reducir el mismo porcentaje de inhibidores presentes en las muestras, como lo haría un kit de extracción de DNA comercial.

Tabla 25. Proporción de muestras positivas de *H. parasuis*, por la técnica de PCR para *H. parasuis*.

Tipo de muestra analizado.		Resultados Totales		
		Total de muestras analizadas	Muestras positivas por PCR	% Positivos
1	Hisopo Articular	6	3	50,0
2	Hisopo abdominal	15	5	33,3
3	Liquido Torácico	21	7	33,3
4	Hisopo Pleural	3	1	33,3
5	Hisopo LCR	8	2	25,0
6	Hisopo Tórax	11	2	18,2
7	Hisopo pulmón	23	3	13,0
8	Tejido Pulmón	89	11	12,4
9	Hisopo pericardico	10	1	10,0
10	Tejido pericardico	11	1	9,1
11	Liquido abdominal	47	4	8,5
12	Hisopo Encéfalo	26	1	3,8
13	Liquido pericardico	30	1	3,3
14	Meninges	12	0	0,0
15	Tejido Encéfalo	21	0	0,0
16	Ganglios	23	0	0,0
17	Liquido articular	15	0	0,0
18	Liquido ventricular	10	0	0,0
19	Hisopo ventricular	3	0	0,0
20	Hisopo Bronquial	4	0	0,0
21	Bazo	6	0	0,0
22	Hígado	5	0	0,0
23	Hisopo nasal	5	0	0,0
24	LCR	34	0	0,0
25	Tonsila	7	0	0,0
TOTAL	25	445	42	9,4

De igual forma, en esta investigación, se pudo observar una baja proporción de detección a partir de muestras del tracto respiratorio superior (12-13%) y no se logró detectar ADN de *H. parasuis* a partir de los hisopados nasales y las tonsilas. Resultados similares fueron reportados por Oliveira y col, (2001 y 2004b), quienes describen al *H. parasuis* como un colonizador normal de la cavidad nasal y tonsilas en cerdos convencionales y animales sanos, razón por la cual, las muestras obtenidas a partir del tracto respiratorio superior no deberían ser empleadas en el diagnóstico de infecciones producidas por este microorganismo en una piara. Igualmente, Olvera A (2006b), determinó que no tiene valor diagnóstico el realizar un análisis a partir de hisopados nasales ó de tonsilas, debido a la presencia de *H. parasuis* en las vías respiratorias superiores en animales sanos y la reacción no-específica positiva con el *A. indolicus*, el cual es un colonizador del tracto respiratorio superior en cerdos.

Sin embargo, otros investigadores como Møller y col, (1993), Amano y col. (1994) y Angen y col, (2007), obtuvieron por la técnica de PCR, resultados exitosos en muestras de hisopados nasales, con lo cual confirmaron que el *H. parasuis* es un habitante normal de la cavidad nasal de los porcinos, concluyendo que esta prueba es altamente efectiva en la detección de este microorganismo a partir del tracto respiratorio superior. Pero la detección en esta región tiene un valor limitado en el diagnóstico de los animales con signos clínicos compatibles con la enfermedad de Glässer. Por otro lado, Segalés y col, (1997), lograron recuperar una mayor cantidad del microorganismo a partir del área de la tráquea en animales sanos.

El rol de *H. parasuis* en las enfermedades producidas en las vías respiratorias de los porcinos es descrito como un proceso complejo a partir del cual se asume que en casos de neumonía, este microorganismo actúa como un invasor secundario oportunista, que causa enfermedad únicamente en asociación con otros agentes bacterianos o virales. Sin embargo, estudios recientes indican que *H. parasuis* puede ser un agente primario de infección en casos de bronconeumonía fibrinosupurativa

(Pöhle y col, 1992, Barigazzi y col, 1994 y Solano y col, 1998, En: Rapp-Gabrielson, 1999).

Igualmente, no fue posible recuperar el microorganismo a partir de bazo e hígado, por aislamiento bacteriológico y ni por PCR, por lo cual se determinó que este tipo de muestras no deberán tenerse en cuenta para el aislamiento del microorganismo en futuros muestreos. Así mismo, no se hizo evidente la detección de ADN de *H. parasuis*, a partir de meninges, encéfalo, ganglios, líquido articular, líquido e hisopo ventricular e hisopo bronquial. Motivo por el cual se presume que la no recuperación a partir de estas muestras, se debió a la inhibición del microorganismo durante el aislamiento. Moser L, (2005) y Oliveira, (2004b), encontraron que el grado de recuperación del microorganismo se incrementa cuando se colecta el tejido completo o un fragmento grande del mismo, con el fin de minimizar la contaminación por flora competitiva y evitar la inhibición de *H. parasuis* durante el crecimiento *in vitro*.

Del Rio y col (2003), igualmente determinaron en su investigación que los tejidos se deben de enviar intactos ó emplear hisopos en lugar de muestras de fluidos en el aislamiento rutinario de *H. parasuis*. Cuando el envío los tejidos completos no es posible, el sistema de hisopos Amies es una buena opción para la recolección de muestras clínicas que están destinadas a ser sembradas en un tiempo no mayor a 48 horas (como, hisopados nasales, lavados intratraqueales y aspirados de articulaciones), de lo contrario, el sistema es poco funcional en la recuperación del microorganismo.

Los hisopados de articulaciones o cerebro se consideran como muestras valiosas en la recuperación de *H. parasuis*, debido a que se ven menos afectadas por microorganismos competentes (Oliveira y col, 2002 y Oliveira, 2004b). Esta idea fue confirmada por Moser, (2005), al observar que las muestras procedentes de articulaciones, encéfalo, cerebro y LCR, son un buen sitio para el aislamiento de *H.*

parasuis, debido a que normalmente hay una baja cantidad de microorganismos competitivos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, las muestras más adecuadas para la detección y diagnóstico del *H. parasuis* por PCR, deben proceder de tejidos, líquidos o hisopos a partir de órganos afectados de origen sistémico como: pleura, pericardio, tórax, articulaciones, abdomen, LCR y pulmón.

3.4. ANÁLISIS DE DATOS.

3.4.1. Evaluación de la concordancia entre las pruebas de cultivo bacteriológico y PCR con el Coeficiente de Kappa.

El 9,23% de las muestras fueron positivas por PCR y el 7,41% de las muestras fueron positivas por cultivo bacteriológico, sin embargo, el 3,14% de las muestras fueron positivas por las dos técnicas de diagnóstico.

Con respecto al análisis estadístico, para calcular la sensibilidad y especificidad, se construyó una tabla de contingencia, donde se comparó la técnica de cultivo bacteriológico (Gold Standard) y la prueba de PCR para el *H. parasuis* (Tabla 26).

Tabla 26. Relación de resultados obtenidos por cultivo bacteriológico y PCR y la presencia ó ausencia de *H. parasuis* en una muestra.

Prueba de PCR		Prueba de Cultivo		
		Presencia	Ausencia	Total
	Presencia	14 (VP)	28 (FP)	42
	Ausencia	19 (FN)	384 (VN)	403
	Total	33	412	445

VP: Verdaderos positivos.	FP: Falsos positivos.
VN: Verdaderos negativos.	FN: Falsos negativos.

Los datos obtenidos tras el análisis por el método 2 x 2 en el programa Epi-Info de la técnica de cultivo bacteriológico y la prueba de PCR con un intervalo de confianza de 95% demostraron una sensibilidad de 42 %, una especificidad de 92 % (Tabla 27). Igualmente, se obtuvo una concordancia global observada entre las dos pruebas diagnósticas de *H. parasuis* de 0.89% (IC 95% 0.85-0.91) con un índice de Kappa de 0,3166 (IC 95% 0.16-0.46),

Tabla 27. Características operativas de la técnica de cultivo bacteriológico “versus” la técnica de PCR para *H. parasuis*, obtenidas en el programa Epi-Info (Epi-Info 6.0d).

Característica operativa	Porcentaje
Sensibilidad	42 %
Especificidad	92 %
Valor predictivo positivo	33 %
Valor predictivo negativo	95 %

La interpretación de los datos obtenidos en esta investigación, según la clasificación de Landis y Koch, (1977), demostraron una fuerza de concordancia débil (Kappa de 0.3), haciéndose evidente una baja concordancia entre las dos pruebas de diagnóstico empleadas. El coeficiente de concordancia Kappa es una herramienta útil que permite conocer el grado de acuerdo intra e inter observador. Al momento de identificar niveles bajos de acuerdos es posible efectuar procesos de ajuste y mejoramiento de la calidad que den lugar a estimaciones precisas y confiables. Una vez realizados estos cambios se pueden obtener nuevas mediciones de confiabilidad con el propósito de conocer el efecto sobre el grado de acuerdo.

Desde un punto de vista estadístico y metodológico, es importante aclarar dos conceptos. En primer lugar, el valor del coeficiente Kappa no proporciona indicación alguna de la precisión de dicha estimación, siendo esencial conocer su variabilidad, con el fin último de plantear test de hipótesis y construir intervalos de confianza para Kappa. Las hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_1) de estos test son $H_0: K = 0$ y $H_1: K \neq 0$. Su resultado indica si el valor del coeficiente kappa es o no estadísticamente significativo, con un determinado nivel de confianza, permitiendo la realización de inferencia estadística (López y col, 1999). En segundo lugar, el coeficiente kappa no aporta información alguna sobre la calidad de la medición realizada por los observadores, pues está diseñado únicamente para estimar la magnitud de la concordancia entre ambos. Por ejemplo, dos observadores pueden presentar una concordancia diagnóstica “casi perfecta” ($K \neq 0,80-1,00$), sin embargo, ambos pueden estar “concordantemente equivocados” respecto al diagnóstico real.

Igualmente, López y col, (1999), estimaron que un valor de $K = 0$, refleja que la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar. Por consiguiente la concordancia observada (0.89%), se estima fue alta con relación a la concordancia esperada (0.84%) (Anexo 12).

Por otro lado, luego de calcular los valores de discordancia entre las dos pruebas se obtuvo que, la probabilidad de encontrar una muestra infectada por el *H. parasuis*, cuando el resultado de la prueba es PCR positiva y cultivo negativa es de 38.8%, mientras que la probabilidad de detección del microorganismo cuando el cultivo es positivo pero PCR negativo es de 29.8%. Por lo tanto se estima que en este estudio hay una probabilidad más alta de detectar una infección por *H. parasuis* en una muestra por PCR que por cultivo bacteriológico. Igualmente la prueba de PCR demostró ser más específica (92 %) y sensible (42 %), sin importar la concordancia baja con la prueba de cultivo bacteriológico, en la prueba de kappa.

Sin embargo, se considero que cada método tiene sus ventajas, y por lo tanto, es necesario tener en cuenta otros factores al momento de decidir un método. Un diagnóstico completo debe soportarse en los signos clínicos, en la presencia y ausencia de lesiones en la necropsia, y en el cultivo bacteriológico soportado de una prueba de PCR (Montelongo y col, 2005).

No obstante la prueba de PCR, se consideró más eficiente y su implementación en los laboratorios reduce considerablemente el tiempo de identificación de las bacterias, obteniendo un resultado altamente, confiable, sensible y reproducible, características de suma importancia para ser implementadas en nuestro país a nivel de control de calidad en la industria porcícola. Igualmente. Oliveira, (2004b) y Montelongo y col, (2005), determinaron que con la prueba de PCR, se logra detectar a el *H. parasuis* a partir de muestras contaminadas y aislamientos negativos, lo cual ayuda a definir la verdadera prevalencia de las infecciones sistémicas al interior de un piara. Sin embargo, se estima que esta técnica, debe estar acompañada de un método tradicional de aislamiento bacteriológico con la finalidad de un buen estudio epidemiológico, ya que el aislamiento bacteriológico se considera todavía necesario para realizar caracterizaciones y comparaciones adicionales de los aislamientos.

En este estudio se considera, que las dos técnicas deben ir acompañadas ya que las dos poseen algunas limitaciones al emplearse por separado. Palzer y col, (2006), sugieren que la técnica de aislamiento bacteriológico de *H. parasuis*, a partir de animales con signos clínicos típicos y hallazgos patológicos, en muestras de tejidos, es poco exitosa y por este motivo debe ir acompañada de una prueba de PCR. Por otro lado, Harmon (2004) considera que la prueba de PCR, puede llevar a resultados negativos, cuando hay un bajo título del agente en el tejido o área localizada. Para evitar esto, se recomiendan utilizar múltiples pruebas, para confirmar el estatus a nivel de piara; igualmente, se debe validar la prueba con estudios de sensibilidad y especificidad, así como del monitoreo constantemente, con la finalidad de asegurar de que está siendo interpretada correctamente y asegurar su eficacia.

3.5. Prueba de ERIC-PCR.

En el presente trabajo, se realizó la clasificación de los aislamientos de *H. parasuis*, mediante el método de genotipificación de ERIC. Esta prueba de PCR, permite amplificar fragmentos de ADN de diferentes tamaños y además revela perfiles específicos del genoma luego de su subsecuente separación por electroforesis (Versalovic y col, 1991; Rafiee y col, 2000b; Oliveira y col, 2003; Montelongo y col, 2005 y Nedbalcova y col, 2006).

Igualmente, como se menciona inicialmente, los elementos de ERIC son altamente conservados entre diferentes especies bacterianas (Versalovic y col, 1991). Por tal motivo, en esta investigación se considero, en la implementación de la técnica de ERIC-PCR, no emplear muestras clínicas de diagnóstico sino únicamente, cultivos bacterianos puros de *H. parasuis*, confirmados por PCR, con la finalidad de asegurar un perfil genómico confiable. No obstante, Oliveira y col (2002), describieron que en la implementación de la técnica de ERIC-PCR, no se requiere de un aislamiento previo del microorganismo, para caracterizar la diversidad de los aislamientos.

El análisis de perfil genético realizado en este estudio, permitió establecer la distancia genética y la coancestría existente entre doce aislamientos colombianos de *H. parasuis*. Cuando el dendograma fue construido, la cepa de control positivo y los aislamientos se dividieron en cuatro conglomerados (clusters) monofiléticos, de acuerdo al índice de consistencia presente entre los nodos cuando las cepas se agruparon con el mismo perfil genético (Figura 17). Diferentes perfiles de ADN son detectados por este método incluso en aislamientos de serovares idénticos de *H. parasuis*. Un reducido número de cepas con similar perfil de ADN fueron responsables de mortalidad en las pjaras afectadas (Olivera y col, 2003).

En este estudio, la agrupación que presentó el índice de consistencia más alto, se evidenció en el clúster o nodo conformado por las cepas C y B con un porcentaje de 92%. Esta similitud observada entre estas dos cepas, probablemente se debe a que estas cepas procedían del mismo origen geográfico y fueron colectadas de una misma granja, no obstante a que fueron colectadas con un intervalo de tiempo de 3 meses y fueron tomadas a partir de diferentes sitios de muestreo (pulmón e hisopo de pericardio respectivamente). Por lo tanto se estima que este clúster lo formo la misma cepa de *H. parasuis* presente en la pjarara. Resultados similares, fueron descritos en el estudio de Montelongo y col, (2005), donde a partir de muestras obtenidas de pulmón, cornetes nasales y liquido cefalorraquídeo de diferentes cerdos en granjas de México, se obtuvo el patrones de huellas genómicas de cuatro muestras por ERIC-PCR y consiguieron diferenciar entre las cepas aisladas de una misma granja.

En otro nodo, donde se observo un valor alto de similitud se presentó entre la cepa empleada como control positivo y la cepa D, con un índice de consistencia de 65%, con lo cual se demostró que comparten un perfil genético similar a pesar de tratarse de cepas de diferente países y de haber sido colectadas con un lapso de tiempo de 11 años (Figura 17).

Por otro lado, en el clúster conformado por las cepas H y F se observó un porcentaje de consistencia de 61%, estas compartían el sitio de aislamiento (pulmón) y el departamento de origen. Y en el clúster conformado por las cepas E y A, se obtuvo un índice de consistencia de 60%, en este caso, las cepas procedían de diferente piara y municipio, pero compartían el mismo sitio de aislamiento (hisopo articular) y departamento de origen (Figura 17).

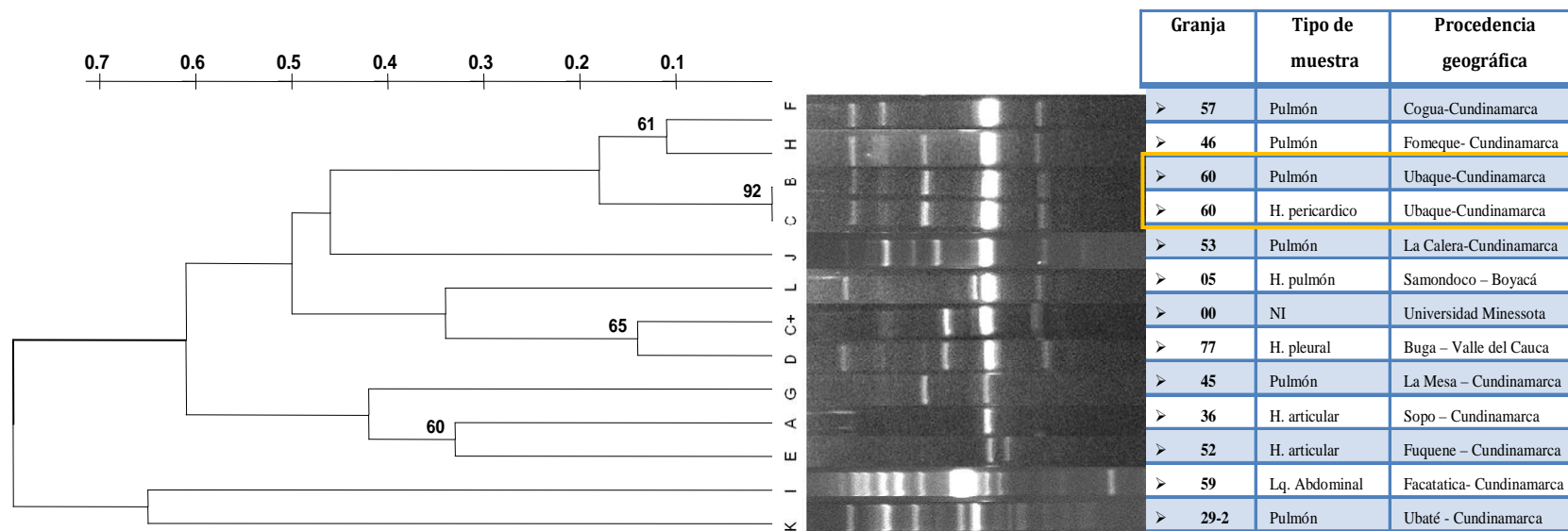


Figura 16. Dendrograma de la diversidad genética por ERIC-PCR, de 12 muestras aisladas en porcinos infectados con *H. parasuis*. La escala indica el porcentaje de similitud genética y los números en los nodos indican el porcentaje de ocurrencia de una ramificación en 100 replicas. En la tabla de datos se indica: el código de la granja, el tipo de muestra y la procedencia geográfica del aislamiento. Las cepas con genotipo similar se encuentran en el recuadro amarillo.

Previamente, se ha sugerido que los elementos repetitivos se logran mantener conservados en diversos géneros de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en diferentes huéspedes (Versalovic y col, 1991, 1994). Oliveira y col (2004a), observaron que la genotipificación por ERIC, a partir de muestras clínicas, puede llegar a mostrar resultados variables cuando los animales han sido tratados previamente con antibióticos o en presencia de flora microbiana natural, comúnmente encontrada en las muestras.

Según, Reynolds y col (1983) y Nei (1972), la distancia observada entre las cepas, se debe principalmente a un proceso de deriva genética. Por este motivo, se estima que las pjaras evaluadas en este estudio, se vieron afectadas por diferentes cepas de *H. parasuis* a excepción del cluster conformado por las cepas C y B, en el cual se presentó el mismo perfil genómico dentro de la misma granja.

Se ha observado, que la relación clonal entre cepas aisladas a partir del tracto respiratorio superior y sitios sistémicos, a partir de aislamientos de *H. parasuis* obtenidos del tracto respiratorio superior difieren considerablemente de los aislamientos realizados en pulmones, pleura, pericardio, articulaciones y cerebro. Igualmente, Smart y col (1988) y Smart y col (1993), observaron que los aislamientos de *H. parasuis* obtenidos a partir de sitios sistémicos y cavidades nasales en cerdos sanos y animales clínicamente afectados, revelaron patrones de REF diferentes. No obstante, Oliveira y col (2003), reportaron no haber encontrado diferencias significativas entre las cepas de *H. parasuis* aisladas a partir de pulmones de cerdos con pulmonía y las aisladas de sitios sistémicos, determinando que la diversidad genética obtenida de estas dos fuentes fue similar. Igualmente, los datos obtenidos en esta investigación, indicaron que no hay alta diferencia en el patrón de huellas genómico entre las doce cepas aisladas de *H. parasuis*, colectadas a partir de sitios respiratorios y sistémicos.

Los resultados reportados por Oliveira y col (2003) y los obtenidos en esta investigación difieren a los resultados reportados por Ruiz y col (2001), los cuales evaluaron la relación clonal entre las cepas de *H. parasuis* obtenidas a partir de sitios sistémicos y del tracto respiratorio, en donde encontraron que las cepas aisladas de sitios respiratorios tenían mayor diversidad genética, en comparación con los aislamientos realizados en sitios sistémicos.

La discrepancia entre los resultados hallados en esta investigación y la de los anteriores autores citados puede deberse a varios factores, tales como:

1) El numero de muestras ó aislamientos caracterizados de *H. parasuis* vario entre estudios. En esta investigación se caracterizaron y compararon 12 aislamientos de *H. parasuis*, mientras que Oliveira y col (2003), evaluaron 98 aislamientos y Ruiz y col (2001), respectivamente evaluaron 53 aislamientos.

2) El método de evaluación de las huellas genómicas vario entre estudios. En esta investigación al igual que en el estudio de Oliveira y col (2003), se realizó la comparación de las huellas genómicas con un programa de computador, él cual facilitó la identificación de las cepas y sus clusters, mientras que en la investigación de Ruiz y col (2001), la asignación de los grupos se realizó por inspección visual. Por tal motivo, se estimó que la comparación de resultados por medio de un programa bioinformático es más confiable, al igual que lo reportado por Oliveira y col (2003), en comparación a una comparación visual de las huellas genómicas.

La mayoría de las cepas analizadas en este trabajo procedían del departamento de Cundinamarca, por lo tanto no fue posible establecer comparaciones a nivel de regiones. Sin embargo, analizando la información por municipios se observó que en el cluster conformado por las cepas obtenidas en granjas ubicadas en los municipios

de Cogua y Fómeque, mostraron la mayor similitud genómica, seguido de la cepa del municipio de Ubaque, la cual estaba integrada en el mismo clúster. Igualmente, se aprecia, que este grupo, está relacionado lejanamente con la cepa del municipio de La Calera.

Por otro lado, se podría deducir que el grupo conformado por la cepa de Samondoco en Boyacá y la cepa de Buga en el Valle del Cauca, guardaron cierta relación genómica. Igualmente, otro grupo en el cual se observó similitud, fue entre la cepa del municipio de Sopo y Fúquene, que a su vez integró dentro de su nodo a la cepa del municipio de la Mesa pudiéndose estimar que lejanamente están relacionadas.

Se observó que en el clúster donde se presentó la mayor distancia genotípica, con respecto a los otros grupos fue el del grupo conformado por las cepas de Facatativá y Ubaté y por lo tanto se estima que, estas granjas fueron afectadas por cepas diferentes a las encontradas en el resto de los municipios de Cundinamarca.

El Haemophilus parasuis es muy variable con respecto a su genotipo y su fenotipo (serotipo). Existen por lo menos 15 serotipos descritos en la literatura, y muchos de los aislamientos que se realizan en campo son no tipificables, empleando las técnicas actualmente disponibles (Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992; Del Rio, Gutiérrez and Rodríguez, 2003; Tadjine, Mittal and Bourdon, 2004). Igualmente, se ha observado que es probable obtener dos cepas bacterianas que expresan diferentes antígenos al momento de serotipificarse, pero que presentan un perfil genético similar por ERIC-PCR. Por este motivo, se considera que los patrones generados por la técnica de ERIC-PCR tienen un alto grado de variación respecto a la tipificación, por lo cual se considera una técnica de baja reproducibilidad, especialmente cuando se realizan estudios comparativos entre laboratorios. A pesar de esto, la prueba de ERIC-PCR es más conveniente que la prueba de tipificación de REP, debido a que los patrones de la prueba de REP son muy complejos (más de 100 bandas) y la

implementación de la técnica es extremadamente exigente. (Foxman y col, 2005 y Olvera y col, 2006b).

En un estudio reciente realizados por Oliveira, (2007b), en la Universidad de Minnesota en el laboratorio de medicina diagnostica veterinaria (MVDL), se realizó el análisis de 116 aislamientos de campo, a partir de los cuales se elaboró una base genómica de *Haemophilus parasuis* y se logró identificar por lo menos 42 genotipos diferentes. A partir del análisis de estos datos, se determinó que el *H. parasuis*, tiene un índice de diversidad de Simpson's (índice de dominancia) más alto que otros patógenos bacterianos encontrados en porcinos, que han sido genotipificado en el MVDL. Lo cual indica que un aislamiento de *H. parasuis*, tiene una probabilidad de 93 % de ser incluida dentro de un único grupo genómico (Simpson, 1949, En: Oliveira, 2007b).

Esta información sugiere que *H. parasuis* tiene un genoma altamente dinámico y probablemente esta sea la razón por la cual el desarrollo de una vacuna universal no ha sido exitoso. A pesar la alta variabilidad genotípica y fenotípica observada, entre los aislamientos de campo de *H. parasuis*, la protección homologa (serovar o cepa específica) es usualmente satisfactoria. Sin embargo, la protección heteróloga en cualquier de los dos casos es parcial o no existe (Oliveria y Pijoan, 2004a). Por consiguiente, la exposición controlada de un animal de 5 días con una dosis baja de (10^4 CFU/ml), con una cepa virulenta viva de *H. parasuis*, en presencia de la inmunidad materna, ha demostrado reducir la mortalidad de los lechones en un 50%, en comparación con las vacunas inactivadas (comerciales o autógenas) (Oliveira y col, 2004c). Estos resultados sugieren que el *H. parasuis*, puede llegar a expresar antígenos importantes *In vivo*, que aparentemente no tiene la capacidad de producir en un cultivo *In vitro* (Oliveira, 2007b).

Igualmente, Rovira y Pijoan, (2004), reportaron que la exposición controlada de un animal con *H. parasuis*, es la mejor opción en las piaras, hasta que se desarrolle una vacuna más efectiva, debido a que permite seleccionar la cepa de desafío, el tiempo y la dosis de infección. Esta práctica de exposición en granjas severamente afectadas podría considerarse como una estrategia para el control de la enfermedad en piaras Colombianas.

Otra aplicación de este tipo de estudios es la elaboración de vacunas autógenas, ya que permite seleccionar la cepa a incluir en la vacuna según el perfil genómico predominante en la granja y superaría las limitaciones de los estudios epidemiológicos basados en la serotipificación donde algunos de los aislamientos de *H. parasuis*, no son tipificables lo cual dificultaría la selección de la(s) cepa(s) a incluir en la autovacuna (Oliveira y col, 2003; 2004a). No obstante, la técnica de genotipificación se debe emplear con precaución en la selección de una vacuna ya que las impresiones genómicas como tal no dicen nada acerca de la protección o antigenicidad de una cepa y únicamente sugieren el nivel de relación genotípico entre ellas en un mismo animal, al interior de una granja o entre piaras (Pijoan y col, 2002; Oliveira, 2007b).

Normalmente, la infección producida por *H. parasuis* se considera de carácter subclínico hasta que una situación de estrés, resulta en la aparición de brotes, (Rosendal y Mitchell, 1983). Dichos brotes de la enfermedad se asocian con factores predisponentes como: hacinamiento, pobres condiciones sanitarias, sistemas de producción de flujo continuo, pobre ventilación, humedad elevada y variaciones extremas de temperatura a lo largo del día, de acuerdo a lo reportado por Nielsen y col, (1975); Sandford y Josephson, (1981); Schultz y col, (1982); Gunnarson y col, (1977) y Pijoan y col, (1983). En este estudio no se consideró el análisis de estos factores pero por su importancia, sería interesante considerar en estudios futuros la relación entre los factores de riesgo y la variabilidad genética.

Finalmente, la realización del presente estudio aporta información a la epidemiología del *H parasuis* en granjas porcinas de Colombia y ofrece a los productores y técnicos del sector herramientas para el diagnóstico bacteriológico y molecular del agente que permitan adoptar de forma más eficiente estrategias para la prevención y el control de la enfermedad.

4. CONCLUSIONES

- En 445 muestras analizadas, se determinó la presencia de 33 (7.41%) cepas positivas de *H. parasuis* en muestras de porcinos, por la técnica de cultivo bacteriológico.
- La mayor susceptibilidad antimicrobiana se observó frente a Norfloxacin (77.8%), mientras que frente a Gentamicina, Cefoxitin, Cloranfenicol, Ceftiofure y Colisina, se apreció una resistencia de los aislados de 88,9%.
- En conclusión, el alto porcentaje de resistencia antimicrobiana observado en esta investigación, enfatiza la importancia del uso prudente de los antimicrobianos en el tratamiento de *H. parasuis*, en las granjas colombianas. Sin embargo, debido a que el aislamiento de *H. parasuis* es difícil y frecuentemente poco exitoso en el aislamiento por cultivo, no se realizó una efectiva ejecución de la técnica de susceptibilidad antimicrobiana.
- Se logró implementar en Colombia, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección del ADN de *Haemophilus parasuis*. A partir de la cual se logró detectar 42 (9.4%) cepas positivas de *H. parasuis*.
- La concordancia entre la prueba de cultivo bacteriológico y PCR, a partir de los resultados obtenidos fue baja (Kappa de 0.3). Sin embargo, se encontró un número relativamente elevado de muestras positivas por las dos técnicas, reflejando la importancia de las infecciones producidas por *H. parasuis* en los porcinos.

- La técnica de PCR para *H. parasuis* tiene ventajas sobre otras técnicas como el cultivo bacteriológico, ya que es de fácil realización, requiere menor tiempo y tiene una alta especificidad y sensibilidad, ya que permitió la detección de la bacteria en muestras de tejidos, líquidos e hisopos de animales infectados naturalmente. Sin embargo, en este estudio se considera, que las dos técnicas deben ir acompañadas ya que las dos poseen algunas limitaciones al emplearse por separado.
- En casos clínicos, las muestras más idóneas de los 25 tipos de muestras empleados, para la recuperación de *H. parasuis* fueron por cultivo bacteriológico hisopo pericárdico, líquido torácico, pulmón, hisopo de pulmón e hisopo abdominal, mientras que por PCR, se detectó más ADN de *H. parasuis* a partir de líquido torácico, hisopo abdominal, hisopo de pulmón y pulmón.
- La técnica de ERIC-PCR es una técnica apropiada para la diferenciación de cepas no relacionadas entre sí de *H. parasuis*. A partir de patrón obtenido en la cepa control y los doce aislamientos de *H. parasuis*, con la ERIC-PCR, se obtuvo un dendograma de distancias genéticas que permitió agrupar las muestras en 4 conglomerados diferentes a partir de la coancestría existente entre ellos.
- El mayor porcentaje de similitud se encontró entre el cluster conformado por las cepas C y B (92 %), este patrón de huella genómica, se encontró limitado a una sola granja ubicada en Ubaque-Cundinamarca y fue considerado como el patrón de una cepa de campo de *H. parasuis* propiamente dicha.

- Se observó que, las cepas evaluadas no compartieron un perfil genómico similar, a excepción de las cepas C y B. Lo cual sugiere, de que las 10 granjas evaluadas y la cepa control, se vieron afectadas por diferentes cepas de *H. parasuis* y por lo tanto de diferentes fuentes de infección.
- El patrón genómico de la cepa D, se considero estrechamente relacionado con la cepa de referencia americana (control positivo), ya que presento un índice de consistencia de 65%, a pesar de haber sido colectadas en un intervalo de tiempo de 11 años.
- Los datos reportados de ERIC-PCR, en esta investigación, indican que no hay diferencia entre las cepas de *H. parasuis* aisladas de pulmón de cerdos y a partir de sitios sistémicos.

5. RECOMENDACIONES.

- La tasa de éxito en el aislamiento de *H. parasuis* a partir de muestras clínicas, puede ser mejorado siguiendo algunas recomendaciones:
 - Tomar muestras de animales sin tratamiento previo con antibióticos y que estén en una fase aguda de infección con el microorganismo. Igualmente, la probabilidad de recuperación del patógeno, aumenta cuando se realiza el muestreo a partir de un animal sacrificado y no a partir de un animal muerto.
 - Un rápido procesamiento de las muestras.
 - Las muestras siempre deben de manipularse y transportarse bajo condiciones estrictas de refrigeración, puesto que *H. parasuis* es muy sensible a altas temperaturas.
 - Adecuadas condiciones de cultivo.
- Se recomienda, el empleo de hisopos con medio de transporte Amies, como medio de envío de muestras colectas en lugares distantes al sitio de procesamiento de la muestra, tiende a mejorar la viabilidad y recuperación de *H. parasuis* durante el transporte.
- Se debe utilizar antibióticos eficaces que no generen resistencias en los microorganismos, lo cual es un factor esencial para evitar la diseminación del agente cuando los cerdos son sometidos a estrés y su inmunidad se ve disminuida, lo cual puede ocasionar la aparición de brotes de enfermedad dentro de las pjaras.

- Debido a las limitaciones de las pruebas de Cultivo bacteriológico y molecular, se deben de monitorear constantemente, con la finalidad de asegurar de que las pruebas están siendo interpretada según lo esperado.
- Se recomienda emplear un método de extracción de DNA, que empleé un kit comercial, para mejorar el porcentaje de detección del *H. parasuis* en muestras de campo.
- Para futuros estudios, es importante realizar secuenciación de las cepas empleadas en ERIC-PCR y comparar estos resultados con los reportados en el GenBank, para determinar la relación epidemiológica entre las cepas.
- Se recomienda ampliar este estudio, serotipificando las cepas circulantes dentro de las piaras y realizar una comparación con la prueba de ERIC-PCR, para determinar la virulencia de las cepas y las variaciones de estas en el tiempo.
- Es necesario realizar jornadas de capacitación a los técnicos y productores, en cuanto a los procedimientos para la toma de muestras con el fin de optimizar el diagnóstico de laboratorio.
- Se debe continuar con esta investigación para poder examinar un mayor número de cepas en diferentes regiones de Colombia y tener una idea clara sobre la epidemiología molecular de las cepas circulantes en el país.
- Se debe soportar el control de la enfermedad producida por *H. parasuis*, en la caracterización de las cepas prevalentes en la granja, la identificación de los picos de infección y el control de los tiempos de vacunación.

- Se recomienda, realizar un estudio específico para aumentar la viabilidad de *H. parasuis* *In vitro*, donde el objetivo sería, evaluar diferentes medios de cultivo reportados por la literatura, con la finalidad de optimizar el diagnóstico bacteriológico.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- AERESTRUP F, M; SEYFARTH A, M; ANGEN Ø. 2004. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Haemophilus sommi* from pigs and cattle in Denmark. *Veterinary Microbiology*. Copenhagen, Denmark. 101: 143-146.
- ALTMAN, D.G. 1991. *Practical statistics for medical research*. New York: Chapman and Hall.
- ALTMAN D.G Y BLAND, J.M. 1994a. *Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity*. *BMJ*.308: 1552.
- ALTMAN D.G Y BLAND, J.M. 1994b. *Statistics Notes: Diagnostic tests 2: predictive values*. *BMJ*.309: 1552.
- AMANO, H; SHIBATA M; KAJIO, N; y MOROZUMI, T. 1994. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. *J. Vet Med Sci*. 56: 639-644.
- AMANO H; SHIBATA M; TAKAHASHI K y SAAKI Y. 1997. Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infections. *Journal Veterinary Medicine Science*. (59):451-455.
- ANGEN, Ø; SVENSMARK, B; MITTAL, K.R. 2004. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Veterinary Microbiology*. (103): 255-258.
- ANGEN Ø; OLIVEIRA S; AHRENS P; SVENSMARK B y LESER T. 2007. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Microbiology*. (119): 266-276.
- ARGIMON, J.M y JIMENEZ, J. 2000. *Métodos de investigación clínica y epidemiológica*. 2ª edición. Barcelona: Harcourt.

- BAKOS, K; NILSSON, A; and THAL, E. 1952. Untersuchungen über *Haemophilus parasuis*. Nord Vet- Med 4: 241-255.
- BIBERSTEIN, E.L y WHITE, D.C. 1969. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. Journal Medical Microbiology. (2): 75-77
- BIGAS A, GARRIDO E, PEREZ A, BADIOLA I, BARBE J, LLAGOSTERA M. 2005. Development of a genetic manipulation system for *Haemophilus parasuis*. Veterinary Microbiology. (105): 223-228.
- BINDER, A. 1997a. Factors Affecting Specificity. <http://www.uni-graz.at/~binder/thesis/node36.html#SECTION00565000000000000000>.
- BINDER, A. 1997b. Used Materials and Precautions. <http://www.uni-graz.at/~binder/thesis/node38.html#SECTION00567000000000000000>
- BIORAD. Manual de instrucciones de la cámara mini sub cell para electroforesis en geles de agarosa. Rev A.
- BLACKALL PJ, PAHOFF JL. 1995. Characterization of *Haemophilus parasuis*, isolated from Australian pigs between 1988 and 1992. Aust. Vet. J., 72:1, 1821.
- BLACKALL, P, J; RAPP-GABRIELSON, V, J and HAMPSON, D. J. 1996. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs. Australian Veterinary Journal. (73):93-95.
- BLACKALL, P,J; TROTT, D, J; RAPP-GABRIELSON, V, J and HAMPSON D, J. 1997. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. Veterinary Microbiology. (56):125-134.
- BURBANO ROSERO MARIELA EDITH. 2002. Validación de PCR Para la Detección de *Listeria monocytogenes* en Leches. Tesis de Maestría en Microbiología con énfasis en Industrial. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- BURR M, JOSEPHSON K, PEPPER I.L. 1996. An evaluation of ERIC-PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. Letters in Applied Microbiology. Volumen 27. p. 24-30.

- CALSAMIGLIA, M; PIJOAN, C; SOLANO, G; RAPP-GABRIELSON, V. 1999. Development of an oligonucleotide-specific capture plate hybridization assay for detection of *Haemophilus parasuis*. Journal Veterinary Diagnostic Investigation. (11): 140-145.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard M31-A2, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- COSTERTON, J.W. ET AL. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. (284): 1318–1322
- COYLE, M. B. 2002. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Department of Laboratory Medicine and Microbiology. University of Washington. Organización Mundial de la Salud (OMS). Seattle, Washington. pp. 236.
- CRISTINA REDONDO; JAIME CUBERO Y PALOMA MELGAREJO. 2009. Characterization of *Penicillium* Species by Ribosomal ADN Sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR Analysis. Mycopathologia. Publicado en Línea el 08 de Marzo del 2009.
- DANIEL WAYNE. 1999. BIOESTADÍSTICA. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Noriega editores UTHEHA. México. pp: 718-722.
- DE LA FUENTE MARTIN A.J, TUCKER A.W, NAVAS J, BLANCO M, MORRIS S.J, GUTIERREZ-MARTIN C.B. 2007. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. Veterinary microbiology. España. Vol.120. p. 184-191.
- DE LA ROSA ZANDRA. 2002. Detección de las infecciones virales congénitas y persistentes por el virus de la Peste Porcina Clásica utilizando RT-PCR anidado y otras técnicas. Tesis de Maestría en Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad Ciencias Postgrado. Bogotá, Colombia. 127 p.

- DEL RIO MARIA L, GUTIERREZ BEATRIS, GUTIERREZ CESAR B, MONTER JOSE L, RODRIGUEZ ELIAS FERRI. 2003. Evaluation of survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* in four liquid media and two swab specimen transport system. American Journal of Veterinary Research. Vol. 64, No. 9:1176-1180.
- DEL RIO, M.L; GUTIERREZ-MARTIN, C.B; RODRIGUEZ-BARBOSA, J.I; NAVAS, J y RODRIGUEZ FERRY, E.F. 2005. Identification and characterization of the *TonB* region and its role in transferrin-mediated iron acquisition in *Haemophilus parasuis*. FEMS Immunology Medical Microbiology. (45): 75-86.
- DEL RIO, M.L; MARTIN, C.B; NAVAS, J; GUTIERREZ-MUNIZ, B; RODRIGUEZ-BARBOSA, J.I y RODRIGUEZ FERRY,E.F. 2006a. *aroA* gene PCR-RFLP diversity patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* species. Research Veterinary Science. (80): 55-61.
- DEL RIO, M.L; NAVAS, J; MARTIN, A.J; RODRIGUEZ-BARBOSA, J.I y RODRIGUEZ FERRY, E. F. 2006b. Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (*fhu*) genes and constitutive expression of the FhuA receptor. Veterinary Research. (37): 49-59.
- DEWHIRST, F. E; PASTER, B. J; OLSEN. I and FRASER, G. J. 1992. Phylogeny of 54 representative stains of species in the family *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S rRNA sequences. American Society for Microbiology. Journal of Bacteriology. Vol 174 (6): 2002-2013.
- DIAZ D; PICCO E.J; ENCINAS T; RUBIO M; LITTERIO N, J y BOGGIO J, C. 2001. Residuos tisulares de nicotinato de norfloxacin administrado por vía oral en cerdos. Revista Archivos de Medicina Veterinaria, Vol.33, No.1, p.37-42.

- Epi Info. 2000. Software bioestadístico para Windows, Version 6.04. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Atlanta, EE.UU. [online] Disponible en la World Wide Web: <http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/EI6dnjp.htm>. [Consultado en: Marzo 1 - 2009].
- FARMACOPEA EUROPEA 5.8 (2007). Mycoplasmas. Appendix 2.6.7.
- FLEISS JL, COHEN J, EVERITT BS. 1969. Large sample standard errors of kappa and weighted kappa. *Psychol Bull*; (72): 323-327.
- FOXMAN, B; ZHANG, L; KOOPMAN, J.S; MANNING, S.D y MARSS, C. F. 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiological Perspectives Innovation*. (2):10.
- FRANS J. DE BRUIJN, 1992. Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 58(7): 2180-2187.
- FUX, C.A; COSTERTON, J.W; STEWART, P.S y STOODLEY, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. Review. *Trends in Microbiology*. Vol. 13. No. 1, pp. 34-40.
- GREENHALGH T. 1997. How to read a paper: papers that report diagnostic or screening tests. *BMJ*. 315: 540-543.
- GUNNARSON A, BIBERSTEIN EL, HURVELL B. 1977. Serologic Studies on Porcine Strains of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: Agglutination Reactions. *Am J Vet Res*. 38(8):1111-1114.
- GUTIERREZ-MARTIN, C.B., GARCIA DEL BLANCO, N., BLANCO, M., NAVAS, RODRIGUEZ-FERRI, E.F., 2006. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Veterinary Microbiology*. 115, 218- 222.

- HAMMER, Ø; HARPER, D.A.T. And RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Version 1.53. Paleontological electronic. Vol. 4, (1): 9 pp.
- HARMON K M. 2004. Real Time PCR for the Detection of *Haemophilus parasuis* in Diagnosis Specimens. Swine disease conference for swine practioners. College of Veterinary Medicine. November 11-12. Iowa. USA. pp: 54-67, 132-133.
- HIGGINS and GOTTSCHALK, En: Bacterial Diseases. Taylor, D.J. Section 3, Chapter 26 - 41. pp: 343,563-570.
- HILL, C.E; METCALF, D.S y MACINNES, J. 2003. A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR. Veterinary Microbiology. (96):189-202.
- HULTON, C, S, J; HIGGINS, C, F& SHARP, P, M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Molecular microbiology, Vol, 5. No4: 825-834.
- KAPLAN, J. B y M. H. MULKS. 2005. Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Veterinary Microbiology. (108): 89-94.
- KIELSTEIN P; ROSNER H y MÜLLER W. 1991. Typing of heat stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of agar gel precipitation and the dotblot procedure. J. Vet. Med., B 38:315320.
- KIELSTEIN P, RAPP-GABRIELSON VJ. 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. Journal of Clinical Microbiology. (30):826-865.
- KIELSTEIN P; WUTHE H; ANGEN Ø; MUTTERS R y AHRENS P. 2001. Phenotypic and genetic characterizations of NAD-dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance. Veterinary microbiology. (81): 243-255.

- KINGSTON J; ZACHARIAH K; TUTEJA U; KUMAR S Y VARDHAN H. 2009. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* isolates from cholera outbreaks in North India. *The Journal of Microbiology*. 47(1):110-115. ▪
- KIRKWOOD, R.N., RAWLUK, S.A., CEGIELSKI, A.C., OTTO, A.J., 2001. Effect of pig age and autogenous sow vaccination on nasal mucosal colonization of pigs by *Haemophilus parasuis*. *Journal Swine Health Prod.* 9, 77-79.
- KUMAR, R; SURENDRAN P.K; THAMPURAN N. 2009. Distribution and genotypic characterization of *Salmonella* serovars isolated from tropical seafood of Cochin, India. *Journal of Applied Microbiology*. 106 (2): 515-524.
- KWONIL JUNG; YOONCHUL HA; SUNG-HOON KIM and CHANHEE CHAE. 2004. Development of Polymerase Chain Reaction and Comparison with In situ Hybridization for the Detection of *Haemophilus parasuis* in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Journal of Veterinary Medicine*. Vol. 66. No. 7. Pp. 841-845.
- KYEONG SEOB SHIN. 2003. Molecular typing of *Serratia marcescens* by RAPD, ERIC-PCR and REP-PCR. *Korean Journal of laboratory medical*. Vol 23: 119-125.
- LANDIS, J.R y KOCH, G.G. 1977. The measurement of the observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33: 159-174.
- LEONARDO A. SECHI; STEFANIA ZANETTI; ILARIA DUPRE; GIOVANNI DELOGU y GIOVANNI FADDA. 1998. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences as Molecular Targets for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *Journal of clinical microbiology*, 36(1): 128-132.
- LI WEN-HSIUNG. 1981. A simulation study on Nei and Li's model for estimating ADN divergence from restriction enzyme maps. *Journal of molecular evolution*. Volumen 17.p. 251-255.

- LINDSAY A; WILSON Y PAUL M. SHARP. 2006. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. Vancouver, Canadá. Molecular Biology Evolution 23(6):1156–1168.
- LO T, WARD C, INZANA T. 1998. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 5 by Multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology. Vol 36. No. 6. p. 1704-1710.
- LOPEZ DE ULLIBARRI I Y PITA FERNANDEZ, S. 1999. Medidas de concordancia: el índice de Kappa. Investigación: Medidas de concordancia: El índice de Kappa. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo. Coruña, España. Vol. 6: 169-171.
- LORA MARTINEZ ANGELA MARIA. 2002. Detección del virus del Síndrome Reproductivo Respiratorio Porcino (SRRP) y del Peste Porcina Clásica (PPC) en muestras de cerdos mediante la técnica de RT-PCR anidada. Tesis para optar al título de Maestría en Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad Ciencias Postgrado. Bogotá, Colombia. 135 p.
- MAC-INNES J.I. & DESROSIERS R. 1999. Agents of the “Suis-ide Diseases” of Swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. Review Article. Can. J. Vet. Res, 63:83-89.
- MAC-INNES J. I, PARADIS M. A, VESSIE G. H, SLAVIC L, WATSON S, WILSON J. B, ARAMINI J. J, DICK P. 2003. Efficacy of prophylactic *Timicosin* in the control of experimentally induced *Haemophilus parasuis* infection in pigs. Journal of swine health and production. Canada. Vol 11, NO 4. pp: 174-180.
- MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS. (OIE). 2004. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Office International Des. Epizooties, Chapter 1.1.4. pp: 1-10.

- MARIA C. RODRIGUEZ-BARRADAS; RICHARD J. HAMILL; ERIC D. HOUSTON; PAUL R. GEORGHIOU; JILL E. CLARRIDGE; RUSSELL L. REGNER Y JANE E. KOEHLER. 1995. Genomic Fingerprinting of *Bartonella* Species by Repetitive Element PCR for Distinguishing Species and Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(5): 1089-1093.
- MARTINEZ E; RIERA P y MALDONADO J. 2006. *Haemophilus parasuis* produces biofilms in vitro. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark. Vol.2. pp: 257.
- MARTINEZ R y MARTINEZ N. 1997. Diseño de Experimentos. Análisis de Datos Estándar y No Estándar. Fondo Nacional Universitario. Bogotá, Colombia. p. 13-36, 39-50,77-101.
- MATSUMOTO M, SUZUKI Y, MIYAZAKI Y, TANAKA D, YASUOKA T, MASHIKO T, ISHIKITA R, BABA R. 2001. *Enterobacterial* Repetitive Intergenic Consensus Sequence-Based PCR (ERIC-PCR); its Ability to Differentiate *Streptococcus pyogenes* Strains and Applicability to the Study of Outbreaks of Streptococcal Infection. *Tohoku J. Exp. Med.* Vol 194. No. 4. pp.205-212.
- MEJIA WAGNER D. C. 2007. Aplicación de Métodos Microbiológicos en planta de sacrificio para la detección de *Salmonella sp*, en canales porcinos. Tesis para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá. pp.134.
- MELNIKOW, E; DORNAN, S; SARGENT C; DUSZENKO, M; EVANS, G; GUNKEL, N; SELZER, P y ULLRICH, H.J. 2005. Microarray analysis of *Haemophilus parasuis* gene expression under *In Vitro* growth conditions mimicking the *In Vivo* environment. *Veterinary Microbiology*. (110): 255-263.

- MENARD, J y MOORE, C. 1990. Epidemiology and management of Glässer's disease in SPF herds. In Annual Meeting of the American Association of Swine Practicioners. Pp. 187-200. Denver.
- MERCK. 2005. Manual de Medios de Cultivos. E. Merck. 12 Edition. Darmstadt, Germany, pp 688.
- MOENNING V. 2000. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Veterinary Microbiology*. 73:93-102.
- MØLLER KRISTIAN y KILIAN MOGENS. 1990. V Factor-Dependent Members of the Family *Pasteurellaceae* in the Porcine Upper Respiratory Tract. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.28, No.12: 2711-2716.
- MØLLER, K, ANDERSEN LV, CHRISTENSEN G, KILIAN M. 1993. Optimization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. *Veterinary Microbiology*, Vol. 36. pp: 261-271.
- MØLLER, K; FUSSING,V; GRIMONT, D; PASTER, B.J; DEWHIRST F.E y KILIAN,M. 1996. *Actinobacillus minor* sp. nov., *Actinobacillus porcinus* sp. nov., and *Actinobacillus indolicus* sp. nov., Three New V Factor-Dependent Species from the Respiratory Tract of Pigs. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol 46 (4): 951-956.
- MONTELONGO, V, VARGAS A, SANCHEZ A, PEREZ MA L., NAHAR A, CIBRIAN A, SAGAHUN A, ALCANTARA, T, PIJOAN,A, CIPRIAN A, Y MENDOZA E.S. 2005. Estudio de la enfermedad de Glässer causada por *Haemophilus parasuis* en México con la técnica de ERIC PCR. XL Congreso nacional de AMVEC XL LEON GTO. JULIO 2005, pp. 210.
- MOROZUMI, T. & J. NICOLET. 1986a. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 23:1, 138-142.

- MOROZUMI, T., & J. NICOLET. 1986b. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. *Journal of Clinical Microbiology.*, 23:1022-1025
- MOROZUMI, T; HIRAMUNE T. 1982. Effect of temperature on the survival of *Haemophilus parasuis* in physiological saline. *National Institute Animal Health Q (Tokyo).* (22):90-91.
- MORRIS, S.J; SLATER, J.D; MASKELL, D.J; SARGENT, C.A; GALINA-PANTOJA, L y TUCKER, A.W. 2006. An *In Vitro* model of *Haemophilus parasuis* infection. Abstract. No. o.38-05. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark. Vol. 1. pp.205
- MORRISON, A. 1992. Screening in Chronic disease. Second edition. New York: Oxford University Press.
- MOSER LORI. 2005. *H. parasuis*-Sampling, diagnostics and autogenous bacterin development. *American Association of Swine Veterinarians.* 207-210.
- NARITA, M., KAWASHIMA, K., MATSUURA, S., UCHIMURA, A., MIURA, Y. 1994. Pneumonia in pigs infected with pseudorabies virus and *Haemophilus parasuis* Serovar 4. *J. Comp. Pathol.* (110): 329–339.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacterias isolated from animals; Approved standards, 2nd ed. Document M31-A2. NCCLS, Eleventh Informational Supplement, Vol 21, N° 1.
- NEDBALCOVA, K; SATRAN, P; JAGLIC, Z; ONDRIASOVA, R y KUCEROVA, Z. 2006. *Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review. Review Article. *Veterinary Medicine.* Vol. 51. (5): 168-179.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106 (949): 283-292.

- NICOLET, J., PAROZ, PH. AND M. KRAWINKLER. 1980. Polyacrilamide gel electrophoresis of whole-cell proteins of porcine strains of *Haemophilus*. Int. J. System. Bact., 30:1, 69-76.
- NICOLET, J. 1992. *Haemophilus parasuis*. Diseases of Swine, 7th edition. Iowa State University Press, pp 526-528.
- NIELSEN, R y DANIELSEN, V. 1975. An outbreak of Glässer's disease: Studies on etiology, serology and the effect of vaccination. Nord Vet Med. (27): 20-25.
- OLIVEIRA S; GALINA L y PIJOAN C. 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. Journal Veterinary Diagnostic Investigation. (13): 495-501.
- OLIVEIRA S y PIJOAN C. 2002a. Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease. Diagnostic Notes. Journal of Swine Health and Production. Vol. 10. No. 5. pp. 221-225.
- OLIVEIRA S; CHOI Y,K; JOO H y PIJOAN C. 2002b. Cloning, sequencing and typing of the 16S rRNA gene of *Haemophilus parasuis*. Proceedings of the 17th IPVS Congress, Ames, Iowa, USA, Vol. 1. pp. 225.
- OLIVEIRA S y PIJOAN C. 2002c. Nuevas ideas de *Haemophilus parasuis* epidemiologia y control. International Pigletter. Vol. 21. No 11. pp. 61-65.
- OLIVEIRA S y PIJOAN C. 2002d. Be exact with *H. parasuis*. Respiratory Disease Pig Progress. Minnesota, College of Veterinary Medicine, USA. p: 22-24.
- OLIVEIRA S; BLACKALL PJ y PIJOAN C. 2003. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by serotyping and genotyping. American Journal of Veterinary Research. (64):435-442.
- OLIVEIRA S, PIJOAN C. 2004a. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Veterinary Microbiology. (99):1-12.

- OLIVEIRA SIMONE. 2004b. Improving rate of success in isolating *Haemophilus parasuis* from clinical samples. Diagnostic Notes. Journal of Swine Health and Production. Vol. 12.No.6:308-309.
- OLIVEIRA S; PIJOAN C y MORRISON R. 2004c. Comparison of *Haemophilus parasuis* control in the nursery using vaccination and controlled exposure. Journal of Swine Health and Production. 12(3):123-128.
- OLIVEIRA SIMONE. 2007a. *Haemophilus parasuis* diagnostics. Diagnostic Notes. Journal of Swine Health and Production. Vol. 15, (2): 99-103.
- OLIVEIRA SIMONE. 2007b. Swine respiratory bacterial pathogens: bacterial overview and vaccine trends. In: J Wiseman, M Varley, S McOrist & B Kemp (Eds), Paradigms in Pig Science (pp.196-178). Nottingham, UK: Nottingham University Press.
- OLSEN, I; DEWHIRST, F.E; PASTER, B.J; BUSSE, H.J. 2005. *Family I. Pasteurellaceae*. The Proteobacteria. In Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 2nd edn. New York. Springer.
- OLVERA A; CALSAMIGLIA M y ARAGON V. 2006a. Genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* field stains. Applied Environmental Microbiology. (72): 3984-3992.
- OLVERA A; SEGALES J y ARAGON V. 2006b. Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods. The Veterinary Journal. pp. 8.
- OLVERA ALEXANDRE. 2006c. Application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of *Haemophilus parasuis*. Tesis para optar al título de Doctor en Bioquímica y Biología molecular. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona, España. pp. 102.

- OLVERA A; CUELLAR-CÉRDA M; NORFRARÍAS M; REVILLA E; SEGALES J y ARAGON V. 2007. Dynamics of *Haemophilus parasuis* genotypes in a farm recovered from an outbreak of Glässer's disease. *Veterinary Microbiology*. Vol 123. No.1-3, pp 230-237.
- OSORNO J, LLANOOUTERS G, OSORNO G. 1998. Epidemiología para Clínicos. Cali, Colombia. p. 1-6.
- PADILLA R, CARLOS Y VENTURA E, GLADIS. 2006. Genotipificación de aislamientos de *Bartonella bacilliformis* por amplificación de elementos repetitivos mediante el uso de REP-PCR y ERIC-PCR. *Rev. Perú. med. exp. salud pública*, jul. /set. 2003, vol.20, No.3, p.128-131. ISSN 1726-4634.
- PALZER A, RITZMANN M, HEINRITZI K, HAFNER-MARX A. 2006. Improving diagnosis of glasser's disease using PCR on serosal swabs. Proceeding of the 19th IPVS congress, Copenhagen, Denmark. Germany. Volume 1.
- PIJOAN C, MORRISON RB, HILLEY HD. 1983. Dilution Technique for Isolation of *Haemophilus* from Swine Lungs Collected at Slaughter. *J Clin Microbiol* 18(1):143-145.
- PIJOAN C, OLIVEIRA S. 2002. *Haemophilus parasuis*: Challenges and changes. American Association of Swine Veterinarians. Center of Swine Disease Eradication, University of Minnesota.pp:251-253.
- PIJOAN, C; OLIVEIRA, S. 2003. Proceedings. AASV, 401-403.
- PUENTE REDONDO, V. DE LA. 2001. Los receptores de transferrina en patógenos porcinos de la familia *Pasteurellaceae*. Distribución y aplicaciones diagnósticas. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- RAFFIE M y BLACKALL PJ. 2000a. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. *Australian Veterinary Journal*. (78): 172- 174.

- RAFFIE M; BARA M; STEPHENS C y BLACKALL P. 2000b. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. Australian Veterinary Journal. (78): 846-849.
- RAPP-GABRIELSON VJ, ROSS RF, NICOLET J. 1986. Characterization of the outer membrane proteins of *Haemophilus parasuis*. Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc., 9:262.
- RAPP-GABRIELSON VJ, GABRIELSON DA. 1992. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am. J. Vet. Res., 53:659-664.
- RAPP-GABRIELSON VJ. 1993. *Haemophilus parasuis*: the association of serovar with prevalence, pathogenicity and immunogenicity. Proc. Alle D Lemman Swine Conf, St. Paul, 20:3133.
- RAPP-GABRIELSON VJ, KOCUR G, CLARK J, MUIR S, WHIGE R. 1996. Efficacy and duration of immunity of the *Haemophilus parasuis* fractions of Suvaxyn" Respirid" MH/HPS. Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc., 14:300.
- RAPP-GABRIELSON VJ, KOCUR GJ, CLARK JT, MUIR SK. 1997. *Haemophilus parasuis*: immunity in swine following vaccination. Vet. Med., 92:8390.
- RAPP-GABRIELSON V.J. 1999. *Haemophilus parasuis*. En: "Disease of Swine". 8 th Edition. Section 3, Chapter 34. Eds. Straw B E, D´Allaire S, Megeling WL, Taylor D J. Iowa State University Press. Ames, Iowa USA. 8: 475-481.
- RAPP-GABRIELSON, V.J; OLIVEIRA, S.R; PIJOAN, C. 2006. *Haemophilus parasuis*. In: Straw, B.E; Zimmerman, J.J; D´Allaire, S; Taylor, D.J. (Eds), Disease of Swine. Blackwell publishing, Iowa. pp. 681-690.
- REYNOLDS, J., B. S. WEIR, AND C. C. COCKERHAM. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. Genetics 105: 767-779. Smith, P. J., R. I. C. Francis, and M. McVeagh. 1991. Loss of genetic diversity due to fishing pressure. Fisheries Research 10: 309 - 316.

- RODRIGUEZ FERRY, E.F., GUTIÉRREZ, C.B., DE LA PUENTE, V., GARCÍA DEL BLANCO, N., NAVAS, J., PANIAGUA, C., DEL RIO, M.L., MONTER, J.L. y J.N: GARCÍA DE LA FUENTE. 2000. Meningitis bacterianas en el cerdo. Enfermedad de Glässer. Investigación en Porcinos. Madrid, España. No. 59: 43-60
- ROSENDAL, S y MITCHELL, W.R. 1983. Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: A survey of Ontario pork producers. Can J Comp Med. (47): 1-5.
- ROVIRA, A y PIJOAN, C. 2004. Control de la enfermedad de Glässer: exposición controlada a *Haemophilus parasuis*. Vol. 30 (11). Universidad de Minnesota. EE.UU. [online] La pagina del Cerdo. Disponible en la World Wide Web: <http://www.3tres3.com>. [Consultado en: Agosto 3 -2006].
- RUBIES X, KIELSTEIN P, COSTA L, RIERA P, ARTIGAS C, ESPUNA E. 1999. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997. España. Veterinary Microbiology. Vol 66. No. 3. pp. 245-248.
- RUIZ A, OLIVEIRA S, TORREMORELL M. 2001. Outer membrane proteins and ADN profiles in stains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. Journal of Clinical Microbiology. (39): 1757-1762.
- SAHAGÚN-RUIZ A, REYES-GUERRA L, ALFONSECA-SILVA E, PEREZ-GALVAN ER, MENDOZA E. 2006. Field Molecular Diagnosis of Glässer's Disease. Abstract. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark. Vol.2. pp: 258.
- SAMBROOK, J., MANNIATIS, T., and E.F. FRITSCH. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Manniatis T and Sambrook Editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Edit Second Edition. New York.

- SAN MILLAN A, ESCUDERO J.A, CATALA A, NIETO S, FARELO F, GIBERT M, MORENO M, DOMINGUEZ L, GONZALEZ B. 2007. β -Lactam Resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by Plasmid pB1000 Bearing *bla*_{ROB-1}. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. Vol 5. No. 6. p. 2260-2264.
- SANDFORD, S. E y JOSEPHSON, G.K.A. 1981. Porcine *Haemophilus pleuropneumonia* epizootic in southwestern Ontario: clinical, microbiological, pathological and some epidemiological findings. Can J Comp Med. (45): 2-7.
- SAXENA MK, SINGH V.P, LAKHCHARUA B.D, TAJ G, SHARMA B. 2002. Stain differentiation of Indian isolates of *Salmonella* by ERIC-PCR. Research in veterinary science. Vol 73. N°. 3. pp. 313-314.

- SCHIMMEL D, KIELSTEIN P, HASS R. 1985. Zur serologische typisierung von *Haemophilus parasuis*. Arch. Exp. Vet. Med. Leipzig, 39:944-947.
- SCHULTZ RA; YOUNG TF; ROSS RF; TESKE DR. 1982. Prevalence of antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* in Iowa swine. Am J Vet Res. (43): 1848-1851.
- SEGALES J. 1996. Enfermedad de Glässer: Conceptos generales de la infección por *Haemophilus parasuis*. Med. Vet., 13:11, 595-605.
- SEGALES J, DOMINGO M, SOLANO GI, PIJOAN C. 1997. Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine. Journal Veterinary Diagnostic Investigation. (9):237-243.
- SHARPLES G, J & LLOYD R,G. 1990. A novel repeated ADN sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. Nucleic Acids Research, Vol, 18 No. 22 pp: 6503-6508.
- SHYAMALA V, SCHNEIDER E, AMES GF. 1990. Tandem chromosomal duplications: role of REP sequences in the recombination event at the join-point. EMBO J. (9):939-946.

- SIMPSON, EDWARD H. 1949. Measurement of diversity. *Nature*. Vol. 163. pp,688.
- SMART NL, HURNIK D, MACINNES JI. 1993. An investigation of enzootic Glasser's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis. *Can Vet J*. (34): 487-490.
- SMART NL, MINIATS OP, MCINNES JI. 1988. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. *Canadian Journal Veterinary Research*. (52):319- 324.
- STACKERBRANDTS ERKO. 2006. Molecular Identification Systematic and Population Structure of Prokaryotes. Editorial Springer. Capitulo 3. Fingerprinting Techniques. pp. 320.
- TADJINE M, MITTAL KB, BOURDON S, GOTTSCHALK M. 2004. Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America. *Journal of Clinical Microbiology* (42): 839-840.
- TRUCCO OLIVIA A. 2002. Estudio de susceptibilidad *in vitro* en *Haemophilus influenzae*. *Revista Chilena de Infectologia*. Vol 19. Suplemento 2. pag: 125-128.
- VAHLE JL, HAYNES JS, ANDREWS JJ. 1997. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CDCD) swine. *Can J. Vet Res*. (61):200-206.
- VAN DE PEER YVES y DE WACHTER RUPERT. 1993. *TREECON*: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees.- In: Computer applications in the biosciences, Vol. 9, p. 177-182.
- VAN OUYEN, A. 2001. New approaches for the Generation and Analysis of Microbial Fingerprints. Elsevier, Amsterdam, pp.31-45.
- VERA-LIZARAZO Y, RODRÍGUEZ-FERRI, E.F., DE LA FUENTE, A.J, GUTIERREZ-MARTÍN, C.B., 2006. Evaluation of changes in antimicrobial

susceptibility patterns of *Pasteurella multocida subsp. multocida* isolates from pigs in Spain in 1987–1988 and 2003–2004. American Journal of Veterinary Research. 67,663-668.

- VERDUGO I, VARGAS R, MARTINEZ J, SERRANO L, GARZA R, GUERRERO A. 2003. Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a Componentes de Matriz Extracelular de Cerdo. Ciencia Veterinaria. México. Vol 9.No 4. p. 269-293.
- VERSALOVIC J, KOEUTH T & LUPSKI J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in *Eubacteria* and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 24. pp: 6823-6831.
- VERSALOVIC J, SCHNEIDER M, DE BRUIJN FJ. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). Methods Cell Mol Biol. (5): 25- 40.
- VIERSTRAETE ANDY. Principle of the PCR. [En línea]. Vanfleteren Jacques. [Germany, 05-01-2004, University of Ghent]. <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>[Consulta: Agosto 7 2007].
- VOS, J. 2004. Proceedings of the 18 IPVS Congress. Intervet Satellite Symposium.
- WISEMAN B, MORRISON R, DIAL G. 1992. Medicated early weaning: Influence of age on growth performance and disease. Proc Am Assoc Swine Pract. pp: 469-475.
- WISSING, A., NICOLET, J., BOERLIN, P., 2001. Die aktuelle antimikrobielle resistenzsituation in der schweizerischen. veterinärmedizin. Schweiz. Arch. Tierheilk. (143): 503–510.
- ZUCKER BA, BAGHIAN A, TRUAX R, O'REILLY KL, STORZ J. 1996. Detection of strain specific antigenic epitopes of the lipooligosaccharide of *Haemophilus parasuis* by use of monoclonal and polyclonal antibodies. Am J. Vet. Res., 57:6367.

7. ANEXOS

ANEXO 1.

Protocolo implementado en la recolección de muestras de campo.

Fecha: _____
 Granja: _____ Departamento: _____ Municipio: _____
 Propietario: _____ Asistente Técnico: _____
 Correo electrónico o fax para envió de resultados.

A. DATOS DE LA GRANJA (Marcar con una X)
Tipo de explotación:

Ciclo completo Cría-precebo Levante-ceba Cama profunda
 Un sitio Dos sitios Tres sitios

B. INFORMACIÓN DE PROBLEMAS CLINICOS
Edad de presentación de signos respiratorios
 3-6 sem. 6-9 sem. 10-13 sem.
 14-17 sem. 18-21 sem. >21 sem.

Edad de presentación de signos nerviosos
 3-6 sem. 6-9 sem. 10-13 sem.
 14-17 sem. 18-21 sem. >21 sem.

Edad de presentación de signos articulares (Cojera).
 3-6 sem. 6-9 sem. 10-13 sem.
 14-17 sem. 18-21 sem. >21 sem.

Porcentaje de morbilidad _____ Porcentaje de mortalidad _____

C. LESIONES OBSERVADAS A LA NECROPSIA

Neumonía Pleuroneumonía Pleuritis
 Abscesos pulmonares Pericarditis. Peritonitis.
 Exudado torácico Exudado abdominal Artritis.
 Exudado en meninges Turbidez del líquido articular.

D. MEDICACIÓN PARA *H. parasuis*.

En agua En Alimento Edad _____ Producto (dosis): _____

E. VACUNACIÓN.
Vacuna contra *H. parasuis* Si No Autovacuna Comercial Edad _____

ANEXO 2.

Preparación de soluciones y medios de cultivo empleados en la investigación.

1) AGAR BASE SANGRE:

Es un medio nutritivo, que provee las condiciones óptimas de crecimiento a todos los microorganismos relevantes. Sirve para el aislamiento y cultivo de diversos microorganismos, sobre todo patógenos exigentes (Merck, 2005).

‣ **Fundamento:** Su abundante base nutritiva ofrece condiciones óptimas de crecimiento a todos los microorganismos presentes. El valor del pH de 6.8, es especialmente favorable para la conservación de los eritrocitos y para la formación de halos hemolíticos claros. Para la determinación de las formas de hemólisis es adecuado añadir de 5 a 8% de sangre estéril desfibrinada de cordero (Merck, 2005).

‣ **Preparación:** Disolver 40 gramos del medio en un litro de agua destilada. Luego disolver completamente el medio por calor hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos, enfriar el medio a 40 - 50°C. Posterior a la esterilización se deja enfriar el medio a 45 a 50 °C y se adiciona 5 a 8% de sangre de ovino, se mezcla con movimientos rotativos suaves y se vierte en placas. pH: 6.8 ± 2 ; (Merck, 2005).

‣ **Composición (g/litro):** Sustrato nutritivo (extracto de corazón y peptona) 20,0 Agar Base Sangre 20,0; cloruro sódico 5,0; Agar-agar 15,0. Aditivo: Sangre desfibrinada de ovino (5%) 50-80 ml (Merck, 2005).

ANEXO 2. Continuación: Preparación de soluciones y medios de cultivo empleados en la investigación.

2) AGAR BASE CHOCOLATE:

El Agar base chocolate o Agar sangre-cocida, es un medio nutritivo excelente. Para la preparación se utiliza Agar base sangre como anteriormente se describió, con la excepción de que la sangre de ovino se agrega sin dejar enfriar el medio (80°C), luego se agita suavemente por 10 minutos y adquiere un color chocolate (Merck, 2005).

3) CALDO DE CEREBRO CORAZON (Brain Heart Broth):

Para el cultivo de diversos microorganismos patógenos exigentes.

- **Fundamento:** Este medio de cultivo se basa en el principio del Caldo ROSENOW preparado con trozos de cerebro (ROSENOW 1919, En: Merck, 2005) y son adecuados para el cultivo de muchas bacterias exigentes (Merck, 2005).

- **Preparación:** Disolver 37 g/litro (Caldo cerebro-corazón) y esterilizar en autoclave por 15 minutos 121°C Dejar enfriar y verter 10 ml en cada tubo de vidrio tapa rosca estéril. pH: 7,4±0,2; (Merck, 2005).

- **Composición (g/litro):** Extracto cerebro, extracto de corazón y peptona 27,5; D (+)-glucosa 2,0; cloruro sódico 5,0; hidrógeno fosfato disódico 2,5; Caldo 15,0, (Merck, 2005).

ANEXO 2. Continuación: Preparación de soluciones y medios de cultivo empleados en la investigación.

4) SUPLEMENTO DE VITOX (OXOID):

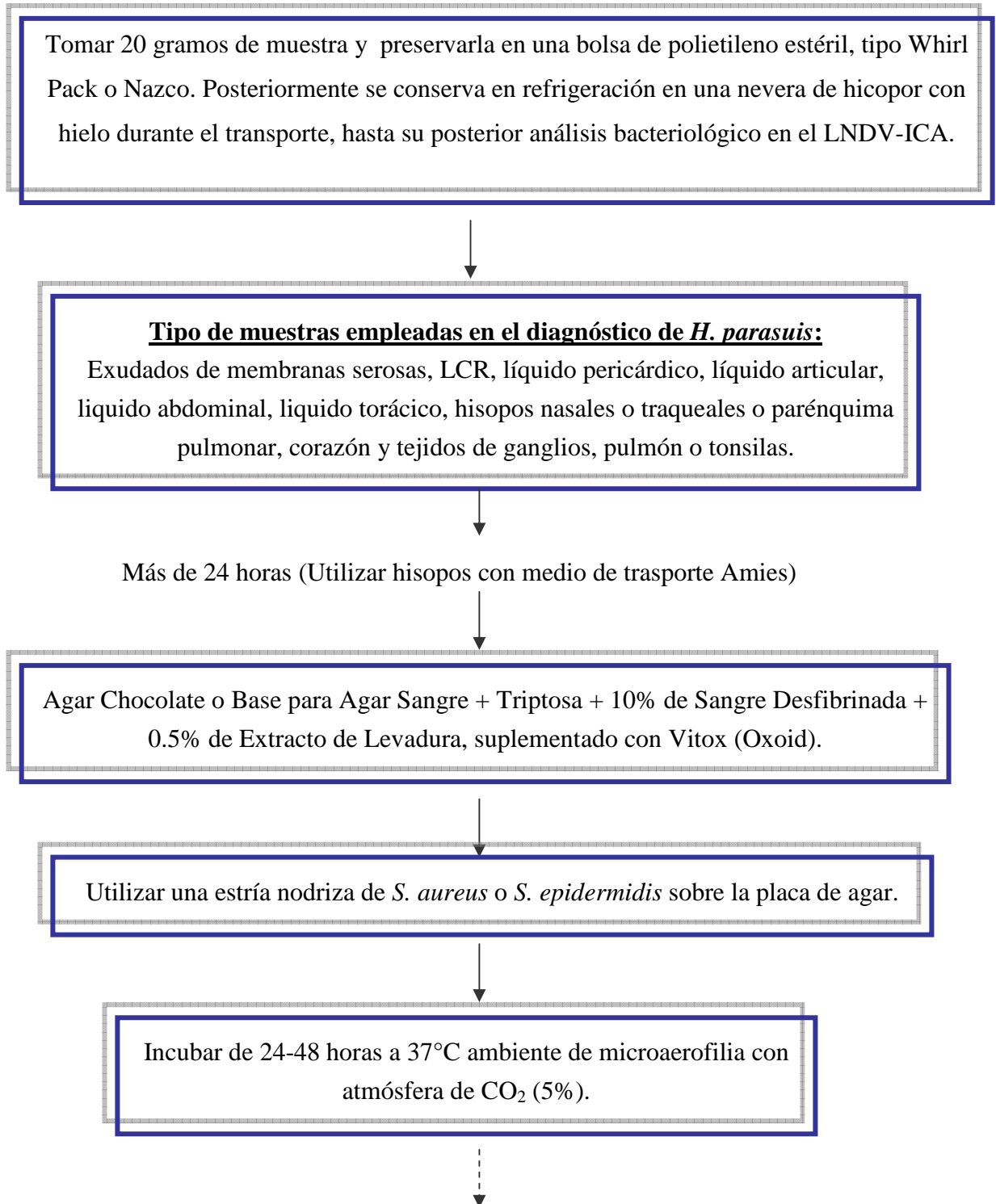
El medio de cultivo recomendado es el Agar chocolate con Suplemento. Este suplemento VITOX (OXOID), debe de agregarse al Agar base sangre o al Agar chocolate antes de ser servido en las cajas de cultivo y contiene los factores X y V y suplementos necesarios para el crecimiento de *H. parasuis*.

5) SOLUCIÓN SALINA 0.85%:

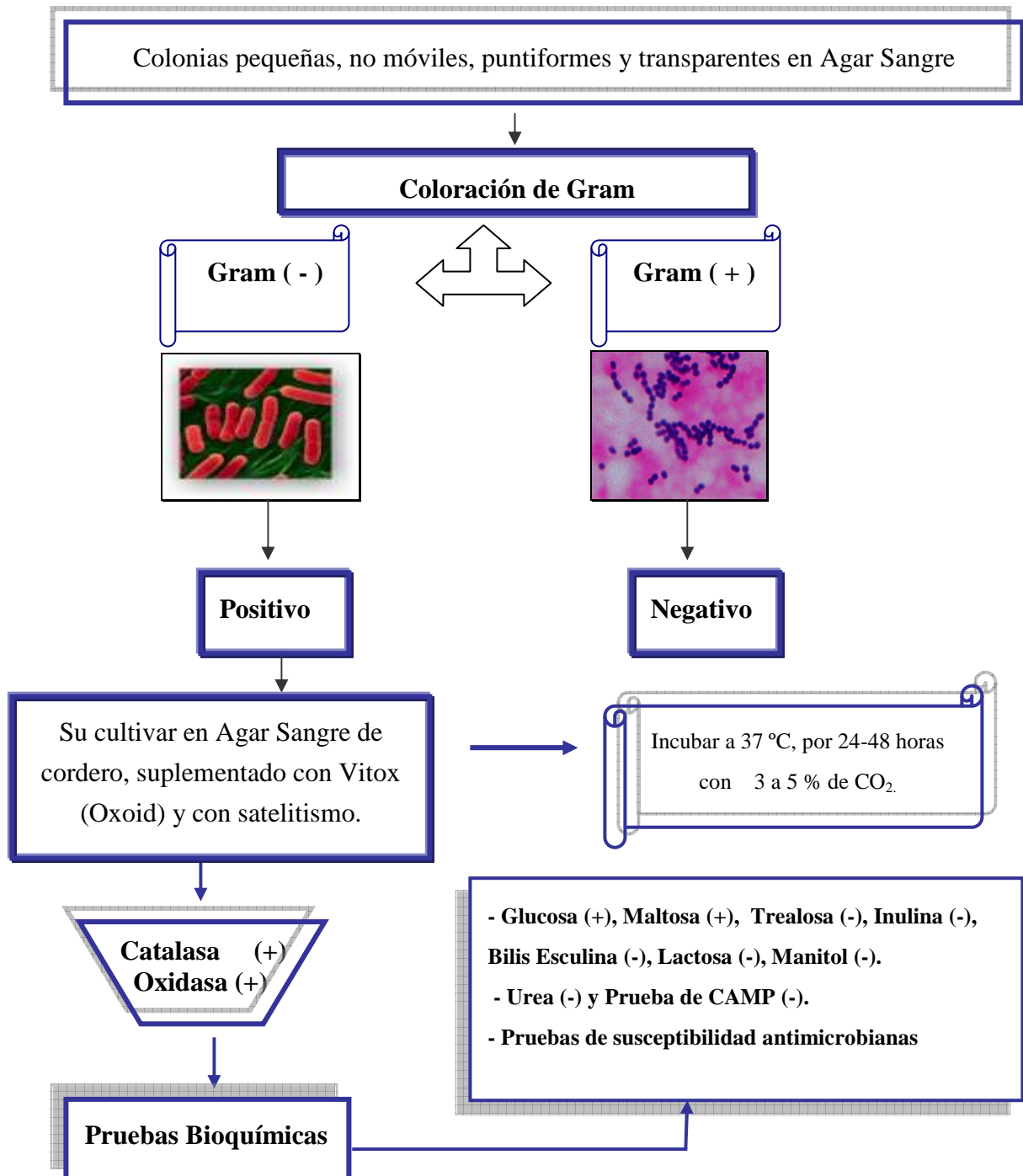
Solución comúnmente utilizada en los laboratorios para resuspender un cultivo y realizar un antibiograma o la coloración de Gram en una lamina.

➤ **Preparación:** Se disuelve completamente el cloruro de sodio en agua destilada, se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 121°C, se sirve en frascos de vidrio tapa rosca pequeños y se conserva en un lugar fresco.

➤ **Composición (g/litro):** Cloruro de sodio (NaCl) 8.5 g y agua destilada 1000 ml.

ANEXO 3.**Flujograma para el aislamiento bacteriológico de *Haemophilus parasuis*.**

ANEXO 3. Continuación: Flujograma para el aislamiento bacteriológico de *Haemophilus parasuis*.



ANEXO 4.

Tabla de diluciones empleada en la elaboración de la escala de Mac-Farland.

Debe prepararse en una serie de 11 tubos de rosca de 13 X 100, adicionado las siguientes soluciones:

No de Tubo	Medir en mililitros		Suspensión bacteriana por ml (x 10 ⁸)
	Cloruro de Bario (1% p/v)	Acido Sulfúrico (1% v/v)	
0.5	0.048	99.5	2
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	0.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

Cerrar herméticamente los tubos de rosca muy bien, rotular cada tubo con su respectivo número y concentración bacteriana. Puede conservarse a temperatura ambiente por un periodo de 6 meses. Se utiliza para calcular una concentración bacteriana aproximada en número de bacterias por mililitro, por comparación óptica de la turbidez de cada tubo con una suspensión preparada a partir de un cultivo bacteriano.

ANEXO 5. Estándar de turbidez de la escala de Mac-Farland, empleado en la preparación del inóculo.

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez de BaSO_4 , equivalente a un estándar 0.5 McFarland o su equivalente óptico. Un estándar de 0.5 McFarland de BaSO_4 se prepara como se describe a continuación:

- (1) Una alícuota de 0,5 ml de 0,048 m/L de BaCl_2 (1,175% p/v $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) se agrega a 99,5 ml de H_2SO_4 de 0,18 mol/L (1% v/v) con agitación constante para mantener la suspensión.
- (2) La densidad correcta del estándar de turbidez debería verificarse usando un espectrofotómetro con una celda de 1 cm de paso de luz con una cubeta de calibración para determinar la absorbancia correcta. De esta manera una absorbancia de 625 nm corresponde a 0,08 a 0,10 para el estándar de 0,5 McFarland.
- (3) La suspensión de Sulfato de Bario debe transferirse en alícuotas de 4 a 6 ml a tubos con tapa atornillada del mismo tamaño que aquellos que se usan para el crecimiento o dilución del inóculo de bacterias.

ANEXO 6. Preparación de soluciones y reactivos empleados en la extracción de *Haemophilus parasuis*.

- **BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) pH 7.4:**

► **Preparación:**

(Lote 047k8207 de SIGMA).

- **Solución A:**

Cloruro de Sódico (NaCl) 8g, Cloruro de Potasio (KCl) 0.2 g, Fosfato de sodio dibasico monohidrogenado (Na_2HPO_4) 115 g, Fosfato de potasio monobásico dihidrogenado (KH_2PO_4) 0.2 g y Agua destilada 800 ml.

- **Solución B:**

Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 0.1 g y agua destilada 100 ml.

- **Solución C:**

Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.1 g y agua destilada 100 ml.

→ Homogenizar cada una de las soluciones hasta disolver completamente los reactivos.

→ Mezclar las tres soluciones en un frasco con capacidad para 1000ml.

→ Medir el pH, el cual debe estar aproximadamente en 7.4.

→ Mantener la solución en un lugar fresco y marcarla con la fecha de preparación. Si se observa turbidez con el paso del tiempo, descartar y preparar una nuevamente.

ANEXO 6. Continuación: Preparación de soluciones y reactivos empleados en la extracción de *Haemophilus parasuis*.

- **AGUA DEPC:**

1. Tomar 1 litro de agua desionizada (MilliQ). Agregar 1 ml de dietilpírocarbonato (DEPC) (SIGMA, D5758) en una cabina de extracción.
2. Mezclar bien hasta que la solución quede homogénea.
3. Tapar bien el recipiente e incubar a 37 °C por un tiempo mínimo de 12 horas o dejar a temperatura ambiente por 24 horas
4. Autoclavar a 15 libras de presión por 20 minutos
5. Dejar enfriar y dispensar en alícuotas en tubos Falcón de 15-50 ml.

- **PROTEINASA K:** (Cat. No. 25530-015 de INVITROGEN).

► **Descripción:**

La Proteínasa K es una proteasa sérica no específica, que no se inactiva por iones metálicos, agentes quelantes como el EDTA, reactivos sulfidrilos o por tripsina o inhibidores de la quimiotripsina. Es estable a un rango amplio de pH (4 a 12,5), con una actividad óptima de pH de 6.5-9.5. La Actividad puede ser estimulada por la adición de agentes denaturantes (SDS y urea). La temperatura óptima de la enzima es a 65° C, pero es 12 veces más activa a 65°C que a 25°C. La rápida denaturación de la enzima ocurre a temperaturas superiores a 65°C.

La autólisis de la enzima ocurre progresivamente a pH alcalino. Sin embargo, la Proteínasa K, no se inactiva completamente por autólisis. Algunos fragmentos de la enzima sirven para el mantenimiento de la actividad proteolítica, incluso luego de una extensiva autólisis.

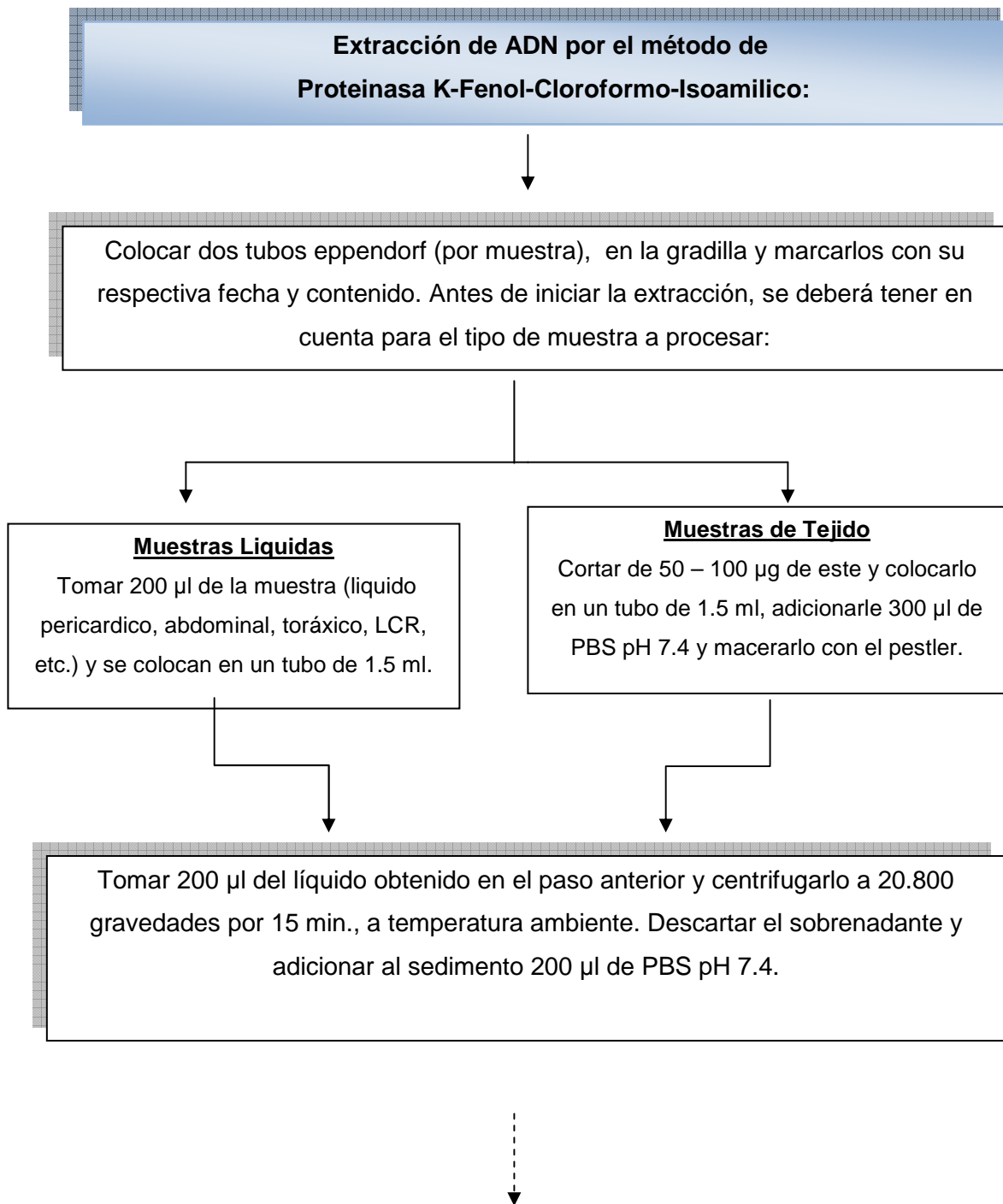
ANEXO 6. Continuación: Preparación de soluciones y reactivos empleados en la extracción de *Haemophilus parasuis*.

► Reconstitución:

Disolver el reactivo en 10 mM de Tris HCl, pH 7.5, 20 mM de Cloruro de Calcio y 50% de glicerol. Posteriormente se alícuota en viales ependorf de 1.5 ml y se almacena a una temperatura de 4°C. El almacenamiento del reactivo reconstituido a -20°C en la ausencia de glicerol puede llevar a la precipitación de la Proteínasa K. En soluciones que se almacenan por prolongados periodos de tiempo a temperaturas de 4°C, puede presentarse crecimiento bacteriano. El Ca²⁺ puede servir como estabilizador para suprimir la autólisis.

► Aplicaciones:

La Proteínasa K es usada en la inactivación rápida de nucleasas endógenas tales como RNasas y Dnasas cuando se aísla RNA o ADN a partir de tejidos y líneas celulares. La enzima

ANEXO 7.**Flujograma para la extracción de ADN de *Haemophilus parasuis*.**

ANEXO 7. Continuación: Flujoograma para la extracción de ADN de *Haemophilus parasuis*.

Resuspende el sedimento obtenido con el buffer PBS pH 7.4 en el Vortex y adicionar, 10 μ l de Proteínasa K de 10 mg/ml, tapar y mezclar suavemente.



Incubar en baño termostataado a 55°C por 3 horas, luego dejar enfriar los tubos y adicionar 220 μ l de la mezcla fenol-cloroformo-isoamílico. Tapar y mezclar los tubos por inversión del tubo.



Centrifugar a 15300 gravedades por 15 minutos. Tomar la fase superior acuosa, y depositarla en un segundo tubo de 1.5 ml, con 1000 μ l de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión suave los tubos y llevar a incubar a - 20°C por aproximadamente dos horas.



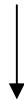
Centrifugar a 20.800 gravedades durante 10 minutos, descartar el sobrenadante y adicionar 1000 μ l de etanol al 70% frío y mezclar manualmente, hasta desprender el sedimento.



Centrifugar a 20.800 g. por 5 min., descartar el sobrenadante y secar el sedimento del tubo, en horno a una temperatura de 60°C durante 10 min.

ANEXO 7. Continuación: Flujograma para la extracción de ADN de *Haemophilus parasuis*.

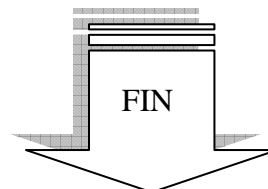
Adicionar al sedimento secado, 60 μ l de agua DEPC tibia e Incubar los tubos por 1 hora a 65°C en el baño termostataado .



Refrigerar los tubos a 4°C, si se va a proceder a r ealizar la PCR inmediatamente o de lo contrario se lleva a -30°C p ara su posterior uso, en la PCR.



Finalmente se resuspende con una pipeta el sedimentó con el agua DEPC.



ANEXO 8. Flujograma del protocolo de la técnica de PCR para el diagnóstico de *Haemophilus parasuis*.

Realizar los cálculos correspondientes de acuerdo al número de muestras a procesar, luego desinfectar la cabina de PCR con hipoclorito de sodio y colocar luz ultravioleta durante 30 minutos antes de comenzar a trabajar

Descongelar y mezclar los reactivos: Agua DEPC, buffer de PCR, MgCl₂, dNTPs e iniciadores, excepto las enzimas y Marcar los tubos y material a usar.

Preparar las premezclas de reacción con los siguientes reactivos: Agua DEPC, buffer PCR, MgCl₂, dNTPs, iniciadores (HPS-F y HPS-R), y la enzima (Taq polimerasa), mezclar muy bien las premezclas, destapar los tubos de 0.2 ml y dispensar en ellos 16 µl de la mezcla de PCR, de acuerdo a la bitácora mostrada a continuación:

Reactivo	Tipo o Nombre / Concentración	Vol. x1 Rx (µl)	VolxRx	Concentración final por tubo
			22	
Agua	-	9,08	199,76	-
Buffer PCR	5x	4	88	1x
MgCL2	25mM	1,2	26,4	1,5mM
dNTPs	10mM	0,4	8,8	0,2mM
HPS-F	10µM	0,6	13,2	0,3µM
HPS-R	10µM	0,6	13,2	0,3µM
Taq Polimerasa	5U/µl	0,12	2,64	0,03U/µl
ADN	-	4	-	4
Vol. Final		20	352	-

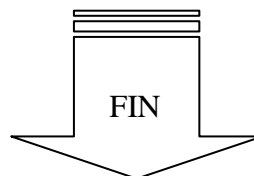
ANEXO 8. Continuación: Flujograma del protocolo de la técnica de PCR para el diagnóstico de *Haemophilus parasuis*.

Adicionar 4 μ l de ADN a cada uno de los tubos de 0.2 ml y llevarlos al termociclador en hielo o nevera



Programación del equipo:

Ciclo	Temperatura
Denaturación inicial	94°C por 5 minutos
Denaturación	94°C por 30 segundos
Anillamiento	59°C por 30 segundos
Extensión	72°C por 2 minutos
Extensión final	72°C por 5 minutos
Mantenimiento	4°C Indefinido.



ANEXO 9. Preparación de soluciones y reactivos empleados en el montaje de la electroforesis.

➤ **BUFFER TBE 10X PARA ADN (1 litro):**

1. Pesar:
 - Tris base: 108 g (Promega, Cat#H5131)
 - Acido bórico: 55 g (Gibco life technologies, Cat#15583-024)
 - EDTA: 8.3 g (SIGMA, ED4SS).

2. Agregar 700mL de agua destilada a un erlenmeyer de 1 litro y adicionar los reactivos anteriormente pesados.
3. Mezclar bien, en una plancha de agitación con magneto.
4. Ajustar el pH a 8.0 con HCl, colocar el electrodo en el buffer. Como esta solución se va mezclando, se le adiciona el HCl hasta que alcanza el pH antes mencionado.
5. Trasvasar el buffer a una probeta de 1 litro y completar a 1 L. con agua destilada.
6. Autoclavar a 15 lb de presión por 20 minutos
7. Para preparar el buffer **TBE 0.5X**, realizar la dilución correspondiente, es decir medir 50 ml del buffer de concentración 10X y adicionar 950 ml de agua destilada. Mezclar bien, y queda listo para utilizarse.

ANEXO 9. Continuación: Preparación de soluciones y reactivos empleados en el montaje de la electroforesis.

➤ **BUFFER TAE 50X (1 litro):**

1. Pesar:
 - Tris base: 242 g (Promega, Cat#H5131)
 - EDTA: 18.61 g (SIGMA, ED4SS)
 - Medir el volumen de Acido acético glacial: 57.1 ml, (J.T: Baker. Cat#9507-03).

2. Agregar 800 ml de agua destilada a un erlenmeyer de 1 litro, adicionar los demás reactivos
3. Mezclar bien, en una plancha de agitación con magneto.
4. Ajustar el pH a 8.0 con HCl, colocar el electrodo en el buffer. Como esta solución se va mezclando, se le adiciona el HCl hasta que alcanza el pH antes mencionado
5. Trasvasar el buffer a una probeta de 1 litro y completar a 1 litro con agua destilada.
6. Autoclavar a 15 lb de presión por 20 minutos
7. Para preparar el **Buffer TAE 1X**, realizar la dilución correspondiente, es decir medir 20 ml del buffer de concentración 50X y adicionar 980 ml de agua destilada. Mezclar bien, y queda listo para utilizarse.

ANEXO 9. Continuación: Preparación de soluciones y reactivos empleados en el montaje de la electroforesis.

➤ **AGAROSA TIPO II:** (Lote: 044k0023de SIGMA).

- **Fundamento:**

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente pero que a altas temperaturas se torna líquida. Esta característica permite una fácil preparación de una matriz porosa para ser usada en electroforesis. Una ventaja que posee la agarosa sobre la acrilamida es que no es un compuesto tóxico y además permite el análisis de ácidos nucleicos con pesos moleculares muy variados. Sin embargo, su poder de resolución es menor que el de los geles de poliacrilamida. La concentración a usar se escoge según el tamaño del ácido nucleico a analizar. Esto porque la concentración de agarosa define el tamaño de los poros de la matriz, a mayor concentración, menor el tamaño de los poros y viceversa.

- **Preparación:**

Una electroforesis típica consiste de los siguientes pasos:

1. Se funde la Agarosa Tipo II a una concentración de 1.5%, en buffer TBE 0,5X. La concentración de agarosa típicamente utilizada para electroforesis está entre el 0.5% y el 2%.
2. Se calienta la preparación por 1 minuto y 30 segundos hasta lograr una solución transparente.
3. A la solución fundida se le adiciona un 1µl de bromuro de etidio por cada 50ml de agarosa y se mezcla.

ANEXO 9. Continuación: Preparación de soluciones y reactivos empleados en el montaje de la electroforesis.

4. Adicionar la agarosa a la cámara de electroforesis a una temperatura que resista la mano y se espera 20 minutos para que se solidifique el gel.
5. Finalmente el gel se sumerge en buffer de TBE 0,5X dentro de la cámara y se retira la peinilla, para que las muestras de PCR puedan ser montadas.

• **Precauciones:**

- El Bromuro de etidio, tiene la propiedad de ser un agente mutagénico de efecto acumulativo, es nocivo por ingestión, tóxico por inhalación e irritante para los ojos, la piel y las vías respiratorias; debe ser manipulado única y exclusivamente por personal capacitado.
- Mantener el envase del reactivo cerrado y en refrigeración (entre 2°C y 8°C).
- La manipulación de este reactivo debe hacerse en un área acondicionada para este fin (paredes y pisos lisos, lavatorios de acero cromado, mesas de trabajo fijos preferentemente de material inerte y resistente a la corrosión, bolsas amarillas para desecho de residuos especiales, recipientes rígidos para descartar residuos punzocortantes, sistema de descontaminación de bromuro de etidio, espátulas de plástico, papel toalla en dispensadores de plástico, entre otros).
- Manipular el reactivo dentro de una campana extractora de gases químicos, considerando las recomendaciones de la ficha de seguridad y las medidas de bioseguridad correspondientes (respirador para vapores químicos, gafas de seguridad, guantes de caucho de nitrilo, mandil manga larga).

ANEXO 9. Continuación: Preparación de soluciones y reactivos empleados en el montaje de la electroforesis.

- ✦ El material usado en el área de trabajo con bromuro de etidio no debe salir del área sin haber recibido tratamiento previo. Todo material haya estado en contacto con este químico, deberá ser descartado en bolsa roja sin excepción.

- **PREPARACIÓN DE MATERIAL CON DIETILPIROCARBONATO:**

NOTA: Para realizar este procedimiento se debe utilizar doble guante y manejar este compuesto en cabina de extracción, ya que es muy tóxico y cancerígeno.

El material de plástico utilizado para la extracción y todos los procedimientos que impliquen el manejo de ARN, se deben tratar con una solución de dietilpirocarbonato, de la siguiente manera:

1. Se prepara en un recipiente amplio de plástico dietilpirocarbonato en una concentración de 0.1% en agua destilada.

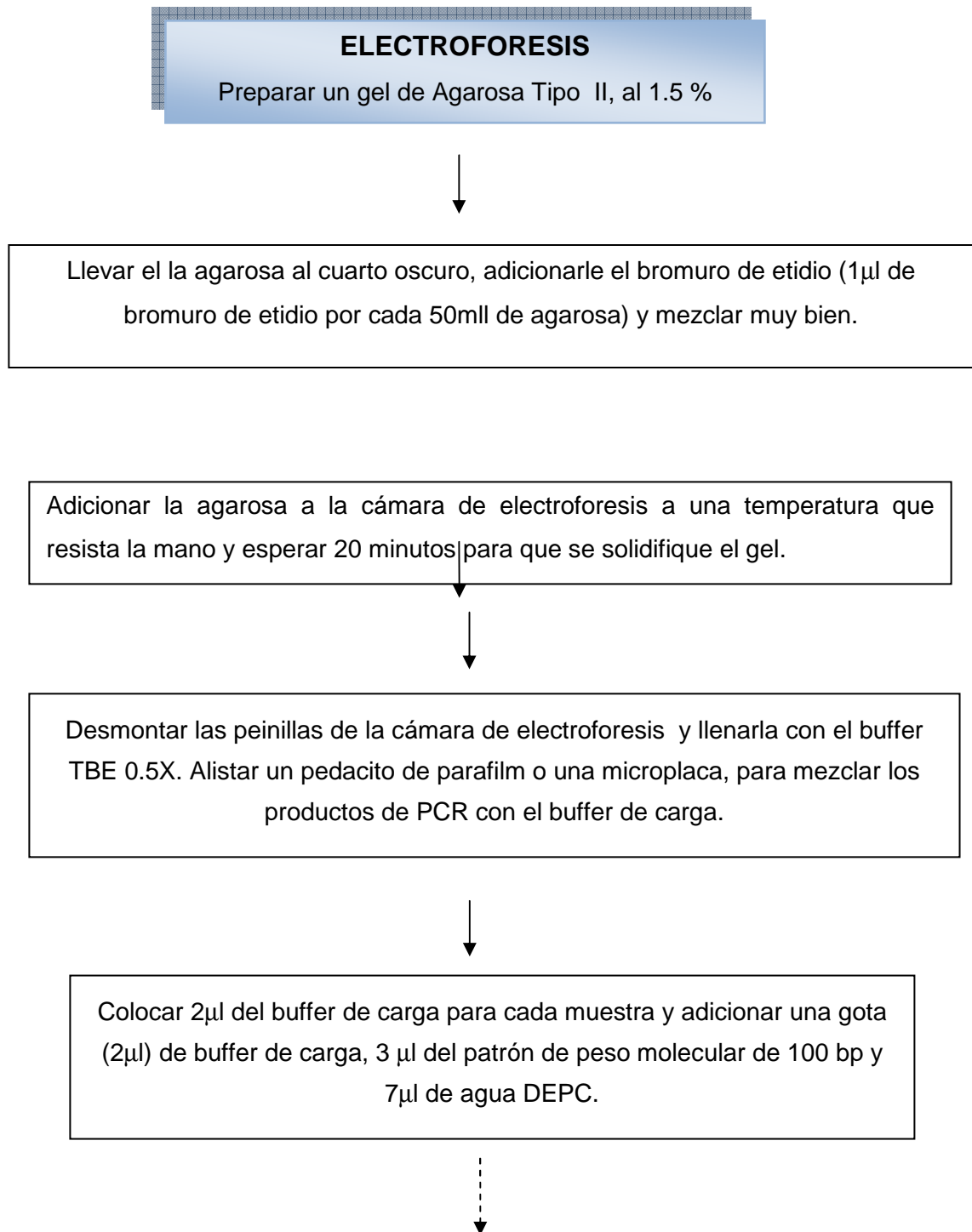
Por ejemplo: Si se van a preparar 15 litros de agua con DEPC se le adicionan 15 ml de dietilpirocarbonato.

2. Mezclar bien esta solución.
3. Sumergir el material a tratar (tubos de 0.2 y 1.5 ml, vénulas de 15 y 50ml, frascos de vidrio, etc.) en la solución de dietilpirocarbonato; de tal manera que esta solución entre en contacto con toda la superficie del material.

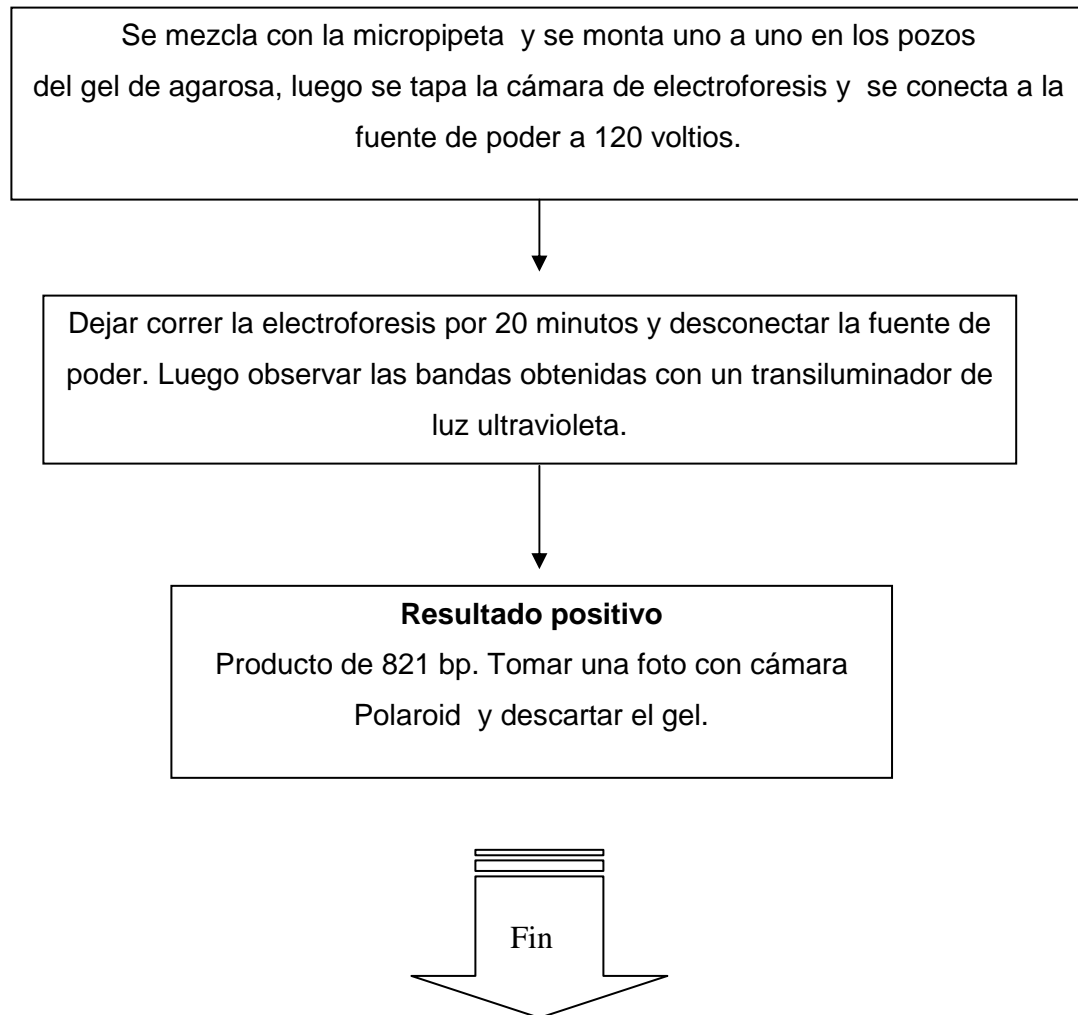
ANEXO 9. Continuación: Preparación de soluciones y reactivos empleados en el montaje de la electroforesis.

4. Tapar el recipiente y dejarlo durante toda la noche /aproximadamente 12 horas) preferiblemente a 37 °C o a temperatura ambiente.
5. Al día siguiente, en la cabina de extracción sacar todo el material a otro recipiente plástico seco para, luego enviarlo a autoclavar a 120°C 15 libras de presión por 20 minutos o en horno a 100°C por 15 minutos, para inactivar el dietilpirocarbonato.
6. Para descartar el agua, también se debe autoclavar a 120°C 15 libras de presión por 20 minutos; y de esta manera se puede descartar por la cañería.
7. El material se pone a secar tapado, en un horno a 60°C hasta que esté completamente seco.
8. Mantener el material en un recipiente cerrado y cada vez que se vaya a utilizar, sacarlo con guantes.

ANEXO 10. Flujograma del protocolo de montaje empleado para los productos de PCR de *H. parasuis*.



ANEXO 10. Continuación: Flujograma del protocolo de montaje y elaboración de la electroforesis, para los productos de PCR de *H. parasuis*.



ANEXO 11. Flujograma del protocolo de la técnica de ERIC-PCR para el diagnóstico de *Haemophilus parasuis*.

Realizar los cálculos correspondientes de acuerdo al número de muestras a procesar, luego desinfectar la cabina de PCR con hipoclorito de sodio y colocar luz ultravioleta durante 30 minutos antes de comenzar a trabajar



Descongelar y mezclar los reactivos: Agua DEPC, buffer de PCR, MgCl₂, dNTPs e iniciadores, excepto las enzimas y Marcar los tubos y material a usar.



Preparar las pre mezclas de reacción con los siguientes reactivos: Agua DEPC, buffer PCR, MgCl₂, dNTPs, iniciadores (ERIC-1F y ERIC-2R), y la enzima (Taq polimerasa), mezclar muy bien las pre mezclas, destapar los tubos de 0.2 ml y dispensar en ellos 22 µl de la mezcla de PCR, de acuerdo a la bitácora mostrada a continuación:

Reactivo	Tipo o Nombre / Concentración	Vol. x1 Rx (µl)	Concentración final por tubo
Agua	-	10.05	-
Buffer PCR	5x	5	1x
MgCL2	25mM	3	3mM
dNTPs	10mM	0,75	0,3mM
ERIC 1 F	10µM	1.5	0,4µM
ERIC 2 R	10µM	1.5	0,4µM
Taq Polimerasa	5U/µl	0,2	0,04U/µl
ADN	-	3	3
Vol. Final		25	-

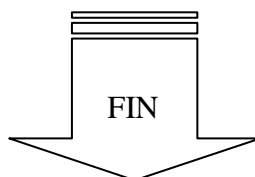
ANEXO 11. Continuación: Flujograma del protocolo de la técnica de ERIC-PCR para el diagnóstico de *Haemophilus parasuis*.

Adicionar 3 μ l de ADN a cada uno de los tubos de 0.2 ml y llevarlos al termociclador en hielo o nevera



Programación del equipo:

Ciclo	Temperatura
Denaturación inicial	94°C por 5 minutos
Denaturación	94°C por 30 segundos
Anillamiento	40°C por 2 minutos
Extensión	72°C por 2 minutos
Extensión final	72°C por 5 minutos
Mantenimiento	4°C Indefinido.



ANEXO 12. Cálculos estadísticos de la prueba de Kappa.

1). Cálculo de la proporción de acuerdos observados:

Po = Cálculo de la proporción de acuerdos observados.

$$Po = \frac{[\text{Muestras positivas observadas}] + [\text{Muestras negativas observadas}]}{[\text{Total muestras analizadas}].}$$

$$Po = \frac{14 + 384}{445}$$

Po = 0.89% de acuerdos observados.

Lo que traduce que la proporción de detectar a el *H. parasuis* en una muestra a partir de un total de 445 muestras analizadas fue de 0.89 por ambas técnicas.

ANEXO 12. Continuación: Cálculos estadísticos de la prueba de Kappa.

2). Calculo de la proporción de acuerdos esperados:

Tabla de frecuencia para los valores esperados*.

		Prueba de Cultivo		
		Positivos	Negativos	Total
		(+)	(-)	
Prueba de PCR	Positivos	14	28	42
	(+)	3.11*	38.88*	
	Negativos	19	384	403
	(-)	29.88*	373.11*	
	Total	33	412	445

- Valor esperado de los verdaderos positivos: $33 \cdot 42 / 445 = 3.11$

- Valor esperado de los verdaderos negativos: $412 \cdot 403 / 445 = 373.1146$

Pe = Proporción de acuerdos esperados.

$$Pe = \frac{[\text{Muestras positivas esperadas}] + [\text{Muestras negativas esperadas}]}{[\text{Total muestras analizadas}]}$$

$$Pe = \frac{3.11 + 373.11}{445}$$

Pe = 0.845 Proporción de acuerdos esperados.

ANEXO 12. Continuación: Cálculos estadísticos de la prueba de Kappa.

3). Calculo de los valores de discordancia:

Igualmente también se evaluaron los valores de discordancia encontrados en ambas pruebas de la siguiente manera:

- Cuando Cultivo (+) y PCR (-): $33 * 403/445 = 29.8\%$
- Cuando PCR (+) y Cultivo (-): $412 * 42/445 = 38.88\%$

4). Calculo del Índice de Kappa de Cohen.

El índice de Kappa de Cohen se midió con la siguiente fórmula:

$$\text{Indicé Kappa} = \frac{\text{Po} - \text{Pe}}{1 - \text{Pe}}$$

Donde: Valores observados – Valores esperados
Discordancia entre ambas pruebas.

$$K = \frac{0.89 - 0.84}{1 - 0.84}$$

$$K = 0.05 / 0.16$$

K = 0.31 Indicé de Kappa.