

# Pleuroneumonía Porcina

## y evolución de la distribución de serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en España

Jaime Maldonado García, Pere Riera Pujadas  
y Eva Martínez Benítez.  
*Laboratorios Hipra*

**Con el propósito de actualizar la información disponible acerca de la distribución de serotipos de App en España y de detectar la posible presencia de serotipos no descritos en el país, se llevó a cabo un estudio de identificación y serotipado de cepas de App aisladas a partir de casos clínicos de PP**

La Pleuroneumonía Porcina (PP) es una de las enfermedades infecciosas de mayor impacto económico en la industria porcina mundial. Su efecto negativo es debido a su amplia distribución y a las pérdidas producidas durante las fases de crecimiento y engorde de los cerdos. Por otro lado, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), que es el agente causal de la PP, puede actuar en conjunto con otros reconocidos patógenos porcinos como *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, virus de la Influenza, virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, *Streptococcus suis* y Circovirus Porcino Tipo 2, entre otros, causando cuadros neumónicos severos y altas

mortalidades. Otro factor que hace de la PP una enfermedad infecciosa de gran impacto, es el hecho de que su erradicación, una vez presente en una granja comercial, es muy difícil de realizar sin un vaciado total de la explotación, posterior repoblación con animales no infectados y un estricto plan de bioseguridad para evitar la reinfección. Lo habitual es la convivencia con la infección, latente en algunos casos, o más frecuentemente en su presentación crónica, en cuyo caso el gasto en tratamientos antibióticos llega a ser considerable.

Las políticas de los países con producciones porcinas altamente industrializadas están promoviendo la utilización racional y la

**Cuadro I. Distribución de los serotipos *Actinobacillus pleuropneumoniae* por áreas y países en el mundo (adaptado de Dubreuil JD y colaboradores. *Anim Health Res Rev.* 2000 Dic;1(2):73-93)**

País	Prevalentes	Dominantes	Referencias
Argentina	1,2,3,5,12	1	Vena <i>et al.</i> , 1997, 1998
Australia	1,2,3,7,12	1	Blackall <i>et al.</i> , 1998; Eaves y Blackall, 1998
Bélgica	2,3,6,7,8,9,11	3	Hommez <i>et al.</i> , 1988, 1990
Brasil	1,3,4,5,7,9	5,3	Piffer <i>et al.</i> , 1997
Canadá	1,2,3,5,6,7,8,10	5,7,1,12	Rosendal <i>et al.</i> , 1981b; Mittal <i>et al.</i> , 1982, 1992, 1998
Chile	1,5	1,5	Olivares y Morgado, 1988
Croacia	2,7,8,9	2,9	Habrun <i>et al.</i> , 1998
Rep. Checa	1,2,7	2	Skollova y Gois, 1987
Dinamarca	1,2,3,5,6,7,8,10,11,12	2	Nielsen, 1982, 1987
Francia	2,3,7,8,9	9	M. Kobisch, 1990
Alemania	2,3,4,5,6,7,9,10	9,2,7	Schimmel y Hass, 1983; Muller <i>et al.</i> , 1986 Kielstein y Whute, 1998
Hungría	1,2,3,5,6,7,9,10,11,12	3,2,7	Fodor <i>et al.</i> , 1989; Molnar, 1990, 1992
Italia	1,2,3,4,5,7	5	Manzart <i>et al.</i> , 1987; Sidoli <i>et al.</i> , 1987
Irlanda	3	3	Power <i>et al.</i> , 1983
Japón	1,2,3,5,6,7,8,9,12	1,2	Chan <i>et al.</i> , 1987; Kume <i>et al.</i> , 1986; Abe <i>et al.</i> , 1996; Fukuyasu <i>et al.</i> , 1996
Corea	2,3,5,7	5,2	Yeh, 1990
Méjico	1,2,3,4,5,6,7,8,9	1,8	Ciprian <i>et al.</i> , 1988; Diaz <i>et al.</i> , 1988; Ontiveros-corpus <i>et al.</i> , 1995
Holanda	1,2,3,5,7,8,9,11	2,9,11	Kamp <i>et al.</i> , 1987
Noruega	2	2	Falk <i>et al.</i> , 1991
Polonia	1,2,5,9	1,9	Molenda, 1988; Tarasiuk <i>et al.</i> , 1991
España	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12	4,7,2	Ferri <i>et al.</i> , 1990; Gutierrez <i>et al.</i> , 1995
Suecia	2,3,4	2	Gunnarsson, 1978
Suiza	2,3,7,9	2	Nicolet, 1988, 1992
Taiwan	1,2,3,5	1,5	Hung <i>et al.</i> , 1991; Chang y Chang, 1994
Reino Unido	1,2,3,5,6,7,8,10	2,3,8	Hunter <i>et al.</i> , 1983; Brandreth y Smith, 1985; McDowell y Ball, 1994
Estados Unidos	1,3,5,7,8,9	1,5,	Schultz <i>et al.</i> , 1983; Hoffman <i>et al.</i> , 1985; Rapp <i>et al.</i> , 1985; Fales <i>et al.</i> , 1989
Venezuela	1,7,4,2,3,6	1	Pinda <i>et al.</i> , 1996

disminución en la cantidad de antibióticos empleados como promotores de crecimiento, suministrados en agua de bebida o de aplicación individual con fines terapéuticos en los cerdos. Frente a esta realidad, el estudio de la patogénesis de la enfermedad, su epidemiología y de la biología de la bacteria den-

tro del ecosistema respiratorio del cerdo, es fundamental para lograr el control efectivo de la infección, la reducción en los gastos ocasionados por los brotes agudos de la enfermedad y el desarrollo de alternativas a la terapia antibiótica, como pueden ser vacunas efectivas y métodos de manejo racionales.

**Cuadro II. Reportes de la distribución de serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en España**

Serotipo	C. B. Gutiérrez <i>et al.</i> 1995 (n=71)	E. F. Rodríguez Ferri <i>et al.</i> 1998 – 2001 (n=798)
	Número de cepas (%)	Número de cepas (%)
1	5 (7,0)	44 (5,5)
2	9 (12,7)	255 (32)
3	1 (1,4)	23 (2,9)
4	30 (42,3)	195 (24,4)
5	0,0	4 (0,5)
6	6 (8,5)	30 (3,8)
7	16 (22,5)	102 (12,8)
8	1 (1,4)	8 (1)
9	1 (1,4)	22 (2,8)
10	0,0	12 (1,5)
11	0,0	23 (2,9)
12	1 (1,4)	3 (0,4)
13	NR	NR
14	NR	NR
UT	1 (1,4)	77 (9,6)

### **Etiología y tipado del agente causal de la Pleuroneumonía Porcina**

App es un bacilo corto, gram-negativo, capsulado con morfología cocobacilar típica y actividad hemolítica, como características más relevantes (Nicolet, 1992). Con base en el requerimiento de NAD para su crecimiento, se puede distinguir entre App biovar 1 (cepas dependientes de NAD) y biovar 2 (cepas independientes de NAD) (Pohl y colaboradores, 1983). Las cepas del biovar 1 son, con diferencia, las que han sido más investigadas. Tradicionalmente se han descrito doce serotipos diferentes pertenecientes al biovar 1 (denominadas 1 a 12). Nielsen y colaboradores (1997) propusieron 2 nuevos serotipos denominados 13 y 14 (siguiendo la secuencia numérica establecida previamente), que correspondían a aislados independientes de NAD (biovar 2) que no compartían antígenos comunes con las cepas del biovar 1 descritas hasta entonces. Recientemente y con base en los singulares perfiles serológicos y toxigénicos de un grupo de aislados de campo australianos, Blackall y colaboradores (2002) han propuesto un nuevo serotipo de App, el serotipo 15, incluido den-

tro del biovar 1. Así pues, en la actualidad está aceptada la existencia de 15 serotipos de App; los serotipos 1 a 12 y el 15 pertenecen al biovar 1; los serotipos 13 y 14 pertenecen al biovar 2. Algunas referencias encontradas en estudios publicados con serotipos 2, 4, 7 y 9 del biovar 2 de App., se derivan de reacciones cruzadas cuando estas cepas se analizan con el mismo panel de antiseros producido frente a los 12 serotipos del biovar 1.

La división de App en biovares es totalmente irrelevante desde el punto de vista clínico. Su utilidad se limita al laboratorio, ya que el aislamiento de las cepas dependientes de NAD requiere la adición de este cofactor al medio (o el co-cultivo de App con alguna bacteria que libere NAD). Por su parte, las cepas independientes de NAD (biovar 2) crecerán de manera abundante en agares no selectivos, como puede ser el agar adicionado de sangre de cordero. Sin embargo desde el punto de vista clínico, cepas pertenecientes a los dos biovares son capaces de inducir infecciones agudas con mortalidad de los animales afectados y las lesiones macroscópicas son indistinguibles. A pesar de este hecho, aparentemente las cepas del biovar 2 de App se aíslan con menor frecuencia que las del biovar 1. Es posible que las cepas del biovar 2 sigan un patrón ge-

**Cuadro III. Resultados del serotipado de 280 cepas de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.**

Año	Número de aislados de cada serotipo (%)														Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Biovar 2	NS	
2002	0	8	1	23	2	0	2	0	3	0	1	0	7	1	48
2003	2	17	0	42	17	0	1	0	5	0	3	2	10	2	101
2004	0	19	1	28	6	0	3	0	12	1	1	6	26	3	106
2005	0	14	0	21	2	0	2	0	3	0	0	2	23	3	70
2006	0	11	3	6	0	0	0	0	4	1	0	1	16	2	44
Total	2	69	5	120	27	0	8	0	27	2	5	11	82	11	369
	(0,5)	(18,7)	(1,4)	(32,5)	(7,3)	(0)	(2,2)	(0)	(7,3)	(0,5)	(1,4)	(3,0)	(22,2)	(3,0)	(100)

NS= No serotipables

ográfico en su distribución, o que su presencia pase desapercibida en el laboratorio debido a su apariencia, que nada tiene que ver con las cepas clásicas de App dependientes de NAD. Las cepas del biovar 2 crecen en abundancia en placas de agar sangre sin más aditivos o suplementos, la hemólisis es llamativa y el tamaño de la colonia es mayor al de un App del biovar 1. Por estas características y apariencia esta bacteria se consideró como "pasteurella-like" cuando se describió inicialmente.

El serotipado de App es importante para entender el patrón de difusión de la enfermedad en un área geográfica, para orientar el tratamiento o la prevención de la enfermedad y para la monitorización epidemiológica de los serotipos presentes en las explotaciones o en áreas geográficas determinadas. No todos los serotipos presentan la misma virulencia, y cepas del mismo serotipo pueden variar en virulencia de un país a otro. El serotipo de cada aislado de App lo determina de manera específica los polisacáridos capsulares (PSC) presentes en su superficie. La composición química y la estructura de los PSC se han descrito ya para todos los serotipos. En general se considera que los PSC son suficientemente diferentes entre sí como para que, una vez inoculados en conejos, generen antisueros específicos para cada serotipo conocido que posteriormente pueden ser empleados para serotipar cepas homólogas.

Son muchas y muy variadas las técnicas de laboratorio que se han empleado para el serotipado de App con base en la detección de los PSC mediante antisueros policlonales. Sin

embargo, ninguna de ellas ha sido totalmente satisfactoria, fundamentalmente por la presencia de reacciones cruzadas debido a la existencia de antígenos comunes a varios serotipos y a la poca reproducibilidad entre diferentes laboratorios. Por otro lado, el uso de anticuerpos monoclonales ha sido útil para el serotipado de cepas de App muy relacionadas entre sí, pero su uso con aislados de campo se ve limitado ya que cualquier variación en el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal puede evitar el reconocimiento de la cepa.

Las limitaciones de las diversas técnicas de serotipado convencional para las cepas de App del biovar 1 (reacciones cruzadas, complejidad, no reproducibilidad, etc.) se ven acentuadas cuando se pretende serotipar cepas de App del biovar 2. Debido a la supuesta composición antigénica común, el serotipado de cepas del biovar 2 se realiza con reactivos (antisueros) que reconocen a las cepas del biovar 1 (no es habitual el uso de antisueros específicos para cepas del biovar 2). Como resultado de ello, los serotipos del biovar 2 que se han reportado en infecciones naturales son el 2, el 4, el 7 y el 9. Curiosamente no hay descripciones publicadas de brotes de Pp producidos por los serotipos 13 o 14, que a su vez los oficialmente reconocidos. Además de esto, se han descrito cepas de campo de App biovar 2 implicadas en brotes clínicos de la enfermedad y que no son tipificables con los reactivos clásicos. Si estos aislados no tipificables representan o no nuevos serotipos, no ha sido aún establecido (Gottschalk *et al.*, 2003).

**Cuadro IV. Serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovar 2 detectados en España entre 2002 y 2006.**

Número de aislados de cada serotipo (%)			
Año	13	14	Total
2002	7	0	7
2003	8	2	10
2004	19	7	26
2005	19	4	23
2006	16	0	16
Total	69 (84,1)	13 (15,9)	82 (100)

## Epidemiología y serotipos de App

Uno de los factores claves en la epidemiología de la Pp es la distribución de serotipos a nivel de explotación, de área geográfica, de país e incluso de continente. El conocimiento de esta distribución se ha empleado durante los últimos años para la implementación de medidas de bioseguridad, la formulación de vacunas y autovacunas, la vigilancia serológica y el control de la importación de animales, entre otras medidas. La distribución de los serotipos de App reportados en diferentes áreas del mundo, así como el serotipo predominante en cada zona, tienen un patrón geográfico. En la **Cuadro I** se observa como los serotipos 2 y 9 son comunes en Europa y el 1 y 5 lo son en América y oriente. Muy probablemente esta distribución por áreas o continentes esté relacionada con el transporte de animales entre países y la restricción de entrada de éstos a algunas zonas, lo cual conlleva a una situación más o menos estable en el tiempo. Una excepción a esta aparente estabilidad es Europa. Si nos remitimos a los datos publicados, (**Cuadro I**) la situación varía entre los diferentes países de la UE. El serotipo 9 es el más prevalente al norte de Europa en países de alta producción porcina, mientras que el serotipo 5 es el más frecuente en Italia.

En España, la distribución de los serotipos de App ha sido estudiada previamente (**Cuadro II**). Sin embargo, los datos más recientes datan del año 2001. España es un país que importa

cerdos de diversos países comunitarios. Además, en España hay una constante adaptación de nuevos sistemas de producción que con frecuencia conllevan a la creación de grandes núcleos de miles de cerdas reproductoras. Tanto el movimiento de animales entre países con diferentes niveles sanitarios, como la implantación de sistemas intensivos de producción afectan la distribución de serotipos de App y la incidencia de la enfermedad. No es de extrañar entonces que la situación de los diversos serotipos de esta bacteria en nuestro país presente modificaciones a lo largo de los años. De la misma manera, los sistemas de identificación y serotipado han evolucionado para App. Hoy en día se cuenta con técnicas moleculares basadas en la PCR, que permiten confirmar la presencia de App en una muestra de pulmón y determinar su serotipo. Estas mejoras en el diagnóstico permitirán una mejor vigilancia de los serotipos tradicionalmente presentes en España, y la identificación de nuevas variantes que puedan pasar desapercibidas por los métodos convencionales de detección o tipado.

Con el propósito de actualizar la información disponible acerca de la distribución de serotipos de App en España y de detectar la posible presencia de serotipos no descritos en el país, se llevó a cabo un estudio de identificación y serotipado de cepas de App aisladas a partir de casos clínicos de PP. La identificación y tipado se realizaron empleando una combinación de técnicas convencionales y moleculares. En algunos casos se realizaron análisis para reconfirmar la identidad y patogenicidad de algunos aislados.

## Materiales y Métodos

### *Bacterias*

Se analizó un total de 369 cepas de campo de App, aisladas entre enero del 2002 y junio del 2006 a partir de pulmones de cerdos en crecimiento afectados por Pp. El aislamiento y los sucesivos pases se realizaron empleando medios de agar sangre (sangre de cordero) y chocolate incubados durante 24-48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas y características de crecimiento, siguiendo protocolos previamente descritos.

### Serotipado

Para la determinación del serotipo de las cepas estudiadas, se empleó la coagulación. La técnica de confirmación empleada fue la hemoaglutinación indirecta. Las cepas para las cuales no se contó con los reactivos de serotipado (cepas del biovar 2), fueron tipadas mediante PCR-RFLP del gen *tbp B* de acuerdo con la metodología descrita previamente (IPVS).

### Determinación de toxinas

Para algunas de las cepas bacterianas, cuyo serotipado dio resultados no esperados, se realizó la detección mediante PCR de los genes de toxinas (*apxI*, II, III y IV), siguiendo protocolos previamente descritos (Frey, J., 2003).

## Resultados y discusión

En el **Cuadro III** se resumen los resultados del serotipado de las 280 cepas de App analizadas en este estudio. Los serotipos predominantes fueron el 4, 2, 13, 5 y el 9. Los serotipos 6 y 8 no fueron detectados durante el período estudiado. Estos resultados coinciden parcialmente con estudios previos hechos en España (**Cuadro II**) en los cuales los serotipos 4 y 2 correspondieron a más del 50% de los aislados. En el presente estudio destacan los serotipos 5 y 9, cuya presencia en España había representado menos del 3% de los aislados reportados. En nuestro caso estos dos serotipos emergen de manera notoria. Igualmente llama la atención la proporción de aislados del biovar 2 detectados en este estudio. Este biovar no había sido descrito en España hasta el pasado año (Maldonado *et al.*, 2004), a pesar de que se aísla con frecuencia a partir de casos clínicos con lesiones agudas de Pp con mortalidades en cerdos de cebo.

Los resultados de la confirmación del serotipo y la presencia de toxinas para los aislados de los serotipos 5, 9 y 13, se correspondieron en la mayoría de los casos con los perfiles de las cepas de referencia. Cabe anotar que las cepas del serotipo 13 (Biovar 2) solo presentan genes para la toxina *apxII*. Este hallazgo no se corresponde con su aparente patogenicidad en el campo.

La vacunación frente a la Pp se realiza empleando diversos preparados como bacteri-

nas, autovacunas, vacunas de subunidades y otros. Es bien sabido que la protección homóloga (la cepa vacunal protege mayoritariamente frente a cepas de campo del mismo serotipo) en casos de Pp es predominante. Por ello, la formulación de autovacunas y de bacterinas ha de ser acorde con los serotipos actuales en una granja o área geográfica. Así, a la luz de los resultados presentados, en España cabe esperar que los preparados vacunales contengan como mínimo los serotipos 2 y 4. Es importante sin embargo, tener en cuenta la emergencia de otros serotipos hasta ahora minoritarios en el país, como son el 5 y el 9. El serotipo 13 ha sido aislado de casos de Pp agudos. En estos casos existe la alternativa de formular una vacuna autógena o de instaurar un programa de control basado en el tratamiento antibiótico, ya que estas cepas muestran una sensibilidad similar a las cepas del biovar 1.

## Referencias bibliográficas

- Blackall, P. J., Klaasen, H. L., Van den Bosch, H., Kuhnert, P., Frey, J., 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet. Microbiol.* 84, 47-52.
- Frey, J., 2003. Detection, identification, and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Methods Mol Biol.* 216, 87-95.
- Gottschalk, M., Broes, A., Fittipaldi, N., 2003. Recent developments on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Proc. 34th Annual Meeting of the AASV, Florida, USA, p. 387.
- Gutiérrez, C. B., Rodríguez Barbosa J. I., Tascón, R. I., Costa, L., Riera, P., Rodríguez Ferri E. F. 1995. Serological characterisation and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Spain. *Vet. Rec.* 137(3), 62-4.
- Maldonado, J., Riera, P., Martínez, E., Llopart, D., Osorio, C. R., Artigas, C. NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* implicated in the etiology of fatal Swine pleuropneumonia. Proc. 18th congress of the IPVS, Hamburg, Germany, Vol. 1, p. 159.
- Nicolet, J., 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Leman, A. D., Straw, B. E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D. J., (Eds), *Diseases of swine*, Iowa State University Press, Iowa, pp. 401-408.
- Nielsen, R., Andresen, L. O., Plambeck, T., Nielsen, J. P., Krarup, L. T., Jorsal, S. E., 1997. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Vet. Microbiol.* 54, 35-46.
- Pohl, S., Bertschinger, H. U., Frederiksen, W., Mannheim, W., 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella haemolytic-like* organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb.nov) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 510-514.