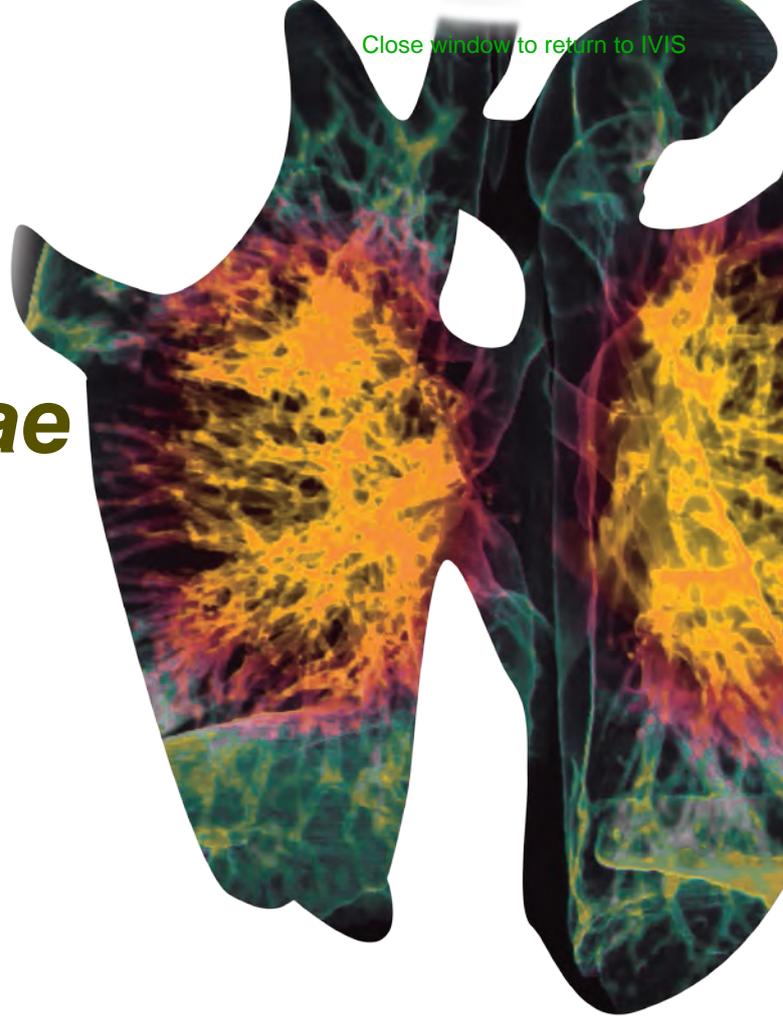


Patogenicidad de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

■ Marcelo Gottschalk

Imágenes cedidas por el autor



► Resumen

La introducción de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) en una explotación *naïve* (que nunca ha tenido contacto con la enfermedad) de animales portadores puede tener como consecuencia la aparición de pleuroneumonía clínica. Por eso, en el control de la enfermedad es una prioridad la identificación de los animales infectados subclínicamente. Se han desarrollado diferentes pruebas para la detección de anticuerpos frente a APP y unas cuantas de éstas se utilizan de forma rutinaria. Algunas pruebas son específicas de especie (detectan todos los serotipos de APP sin diferenciarlos), mientras que otras identifican el serotipo/serogrupo implicado. La interpretación de estos datos requiere información actualizada sobre serotipos importantes recuperados de cerdos enfermos en una zona o país determinado. Últimamente se han desarrollado métodos de serotipificación basados en técnicas moleculares que están listos para utilizarse por la mayoría de los laboratorios de diagnóstico. Excepcionalmente, cuando se obtienen resultados serológicos no concluyentes, a veces se intenta la detección directa de APP en las amígdalas. El uso correcto y la interpretación de las pruebas de diagnóstico es esencial para el control de la pleuroneumonía en las explotaciones porcinas.

Palabras clave: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pleuroneumonía, serotipificación

► Summary

***Actinobacillus pleuropneumoniae* heterogeneity of pathogenicity**

The introduction into a naïve herd of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) carrier animals may have as a consequence the appearance of clinical pleuropneumonia. As such, the identification of subclinically infected herds is a priority in the control of the disease. Different tests for the detection of antibodies against APP have been developed and a number of these are routinely used. Some are APP species-specific tests (detecting all serotypes of APP without differentiate them) whereas others identify the serotype/serogroup involved. The interpretation of such data requires good information about prevalent serotypes present in a country. Serotyping methods based on PCR techniques have been developed lately and should be used by most diagnostic laboratories. Exceptionally, direct detection of APP from tonsils of carrier animals should be performed. The correct use and interpretation of diagnostic tests is essential to control pleuropneumonia in swine herds.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pleuropneumonia, serotyping

Contacto con el autor: Faculty of veterinary medicine, University of Montreal. Email: marcelo.gottschalk@umontreal.ca

La pleuroneumonía porcina causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) es una enfermedad contagiosa que causa importantes pérdidas económicas en todo el mundo. Los principales signos clínicos de la enfermedad aguda son anorexia, depresión, fiebre, tos, disnea y/o polipnea [1]. La enfermedad puede evolucionar muy rápidamente y a las pocas horas se puede producir la muerte de algún animal. También puede tomar una forma crónica donde los signos clínicos no son tan evidentes, pero produce pérdidas de producción y, por lo general, se observan lesiones en las canales (como adherencia, pleuritis y abscesos pulmonares). En muchas explotaciones APP está presente en una forma subclínica. Esto sucede a menudo en los rebaños convencionales, que pueden estar infectados simultáneamente no sólo con diferentes serotipos de baja patogenicidad, sino también con serotipos más virulentos [1]. En este último caso, los brotes pueden aparecer de repente en presencia de enfermedades concomitantes o como consecuencia de medidas de manejo. Por lo tanto, la identificación temprana de los rebaños infectados subclínicamente es importante para el control total de la enfermedad, como los animales portadores son una de las principales fuentes de transmisión entre los rebaños. La presentación de un brote de enfermedad clínica está relativamente bien controlado en los EE. UU. y Canadá, pero es un problema importante en muchos países de América Latina, el Caribe, Asia y Europa. En América del Norte, los esfuerzos se han dirigido principalmente a monitorizar infecciones subclínicas en la cría de rebaños y mantenerlos libres de cualquiera de los serotipos comunes más virulentos de APP o de todos los serotipos de APP. Se observan casos clínicos ocasionales en explotaciones con un alto estado sanitario, infectadas con serotipos no típicamente asociados con la enfermedad en el pasado. La normalización y la aplicación de nuevas herramientas de diagnóstico ha tenido un tremendo impacto en el diagnóstico y control/eliminación de estas infecciones subclínicas. Se han producido situaciones en las que los profesionales experimentados han tenido que tomar decisiones difíciles sobre el estado de las explotaciones, en particular el trabajo con multiplicadores y núcleos. Excepcionalmente, algunas

► Clasificación

APP puede clasificarse en función de sus características de crecimiento *in vitro* y necesidades de factor V (NAD) en el biotipo I (NAD-dependiente) o biotipo II (NAD-independiente) [1]. Los veterinarios deben ser conscientes de que los aislados de biotipo II, a veces conocido como APP atípico, pueden causar problemas clínicos y no pueden identificarse fácilmente en los animales portadores mediante procedimientos de aislamiento que han sido estandarizados para detectar el típico biotipo I. Actualmente hay 15 serotipos reconocidos de APP (según la composición del polisacárido capsular). De estos, los serotipos del 1 al 12 y el 15 se han descrito como biotipo I APP, y los serotipos 13 y 14 como el biotipo II atípico. Sin embargo, algunas cepas europeas de los serotipos 2, 4, 7 o 9 también pueden ser biotipo II atípicos y los aislamientos de América del Norte del serotipo 13 son del biotipo I. Algunos serotipos comparten antígenos comunes (en el LPS); estos antígenos se utilizan actualmente en pruebas serológicas y se clasifican en grupos serológicos: serotipos 1, 9 y 11; serotipos 3, 6, 8 y 15; serotipos 4 y 7 [1].

de estas situaciones han terminado en los tribunales de justicia.

DISTRIBUCIÓN DE SEROTIPOS: EL PROBLEMA DE LA SEROTIPIFICACIÓN

La serotipificación de APP es de gran interés, ya que diferentes serotipos tienen diferente potencial de virulencia en función del origen geográfico (tabla 1). Casi no hay datos públicos disponibles de la distribución de los serotipos en la mayoría de los países durante los últimos 20 años. La serotipificación completa usando anticuerpos con una variedad de pruebas serológicas es proporcionada por muy pocos (si los hay) laboratorios de referencia especializados en diferentes países. Además, las reacciones cruzadas con anticuerpos observadas a menudo impiden la correcta

identificación de algunos serotipos. Para superar estos problemas, recientemente se han desarrollado varias técnicas moleculares (principalmente PCR) que pueden adaptarse fácilmente y deben utilizarse a partir de ahora por los principales laboratorios de diagnóstico [2]. De hecho, desde la vigilancia serológica para la detección de los animales infectados subclínicamente en granjas convencionales deben dirigirse hacia los serotipos más importantes de un determinado país o continente, los datos de la serotipificación son indispensables. Además, las vacunas de células enteras (bacterinas: comerciales o autógenas) proporcionan protección frente a un serotipo específico [1]. La prevalencia de un serotipo debe estar estrechamente asociada a los serotipos recuperados de animales enfermos, lo que sería una indi-

Tabla 1. Serotipos APP comúnmente asociados con la enfermedad en diferentes áreas.

Área	Serotipos
América del Norte	5, 7, 8 ^{a,b}
América latina ^c /Caribe ^c	1, 5, 7
Europa occidental ^e	2, 9, 11, 8 ^b , 5, 4 ^d
Europa oriental ^{c,e}	1, 9, 2, 5, 7, 8
Asia ^c	5, 2, 9, 1
Australia	15, 7, 5

^aExplotaciones con alto estado sanitario.

^bConfirmación por PCR: Reino Unido.

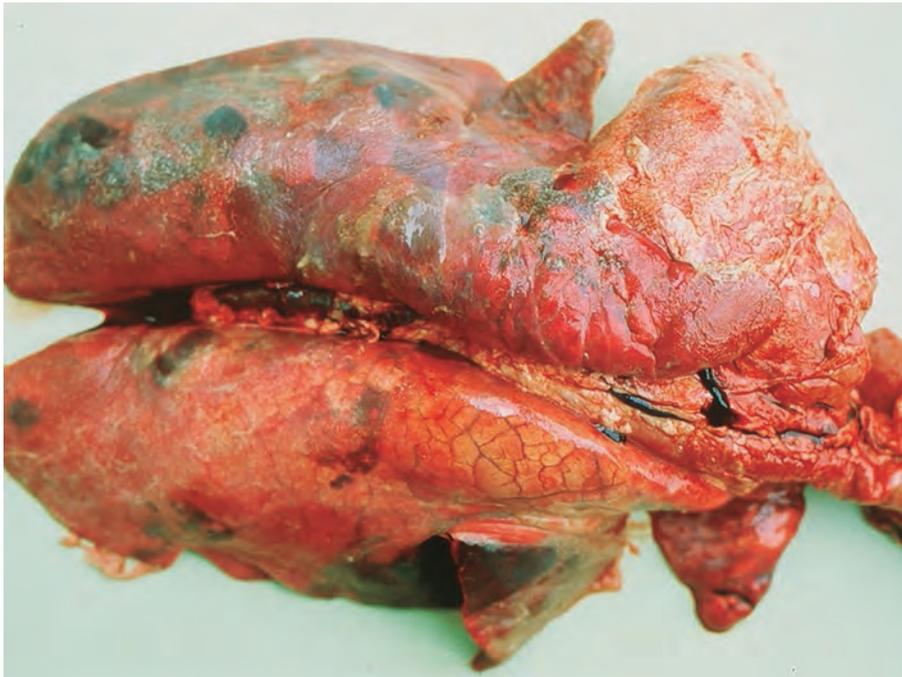
^cDatos disponibles en muy pocos países (muchos: datos no publicados).

^dSólo en España, raro en otros países.

^ePocos datos disponibles: República Checa, Croacia, Polonia.

(Nota: en la mayoría de los países no hay datos disponibles desde los últimos 20 años).

ARTÍCULOS



La evolución de la enfermedad difiere de unos animales a otros, dependiendo de la extensión de las lesiones pulmonares y del tiempo de iniciación del tratamiento terapéutico.

cación de los serotipos más virulentos en una región/país específico. Para APP, los serotipos que son altamente prevalentes por serología o mediante la detección de animales portadores infectados subclínicamente son a menudo diferentes de los recuperados con frecuencia de los animales enfermos, como se muestra recientemente en Canadá [3]. Además, algunos serotipos (como los serotipos 6, 8, 12 y 15) presentan un alto grado de transmisión, incluso en ausencia de signos clínicos, así las explotaciones infectadas por estos serotipos se detectan más fácilmente por serología, especialmente cuando se estudia un número reducido de animales y explotaciones.

Prevalencia de los serotipos

Es importante tener en cuenta que la prevalencia de los serotipos entre animales enfermos también pueden cambiar con el tiempo, haciendo hincapié en la necesidad de una vigilancia continua. Históricamente, los serotipos 1 y 5 se consideraron altamente virulentos en América del Norte y la mayoría de los casos clínicos fueron causados por estos serotipos. Esto ha cambiado en los últimos 15 años: el serotipo 1 del APP es actualmente muy raro, probablemente como consecuencia de la ausencia de este serotipo en los animales de la mayoría de las explotaciones. En Canadá, el 80 % de los aislados recuperados

de casos clínicos en explotaciones convencionales pertenecen a los serotipos 5 o 7, en proporciones similares. Estos dos serotipos deben considerarse como los más importantes en explotaciones comerciales en América del Norte, ya que, por lo general, los casos clínicos causados por estos dos serotipos dan como resultado una alta mortalidad. Las explotaciones con un alto estado sanitario de América del Norte a veces se infectan por APP; sin embargo, en general, los casos clínicos observados en dichas explotaciones son casos esporádicos con mortalidad relativamente baja, pero alta morbilidad, causadas en su mayoría por los serotipos 8, 12 o 15 (datos no publicados). Otro ejemplo de conmutación del serotipo es Corea: el serotipo 1 estuvo ausente en este país hasta 2005, cuando se introdujo probablemente a través de animales portadores: el 10 % de los aislados ya pertenecía a este serotipo entre

2006 y 2010, y un tercio de los aislamientos recuperados de animales enfermos en 2014 son del serotipo 1.

CEPAS QUE PERTENECEN AL MISMO SEROTIPO, PERO CON DIFERENTE VIRULENCIA

Como puede observarse en la *tabla 2*, la virulencia de los aislamientos que pertenecen a un mismo serotipo puede variar, por lo general, en función del origen geográfico. Los animales infectados experimentalmente con cepas francesas de APP serotipo 2 mostraron signos clínicos unas pocas horas después de la inoculación y presentaron una alta mortalidad. Los animales infectados con cepas canadienses del mismo serotipo no presentaron ningún signo clínico, ni fiebre (observaciones no publicadas). Hay una clara diferencia entre los dos grupos de cepas serotipo 2: las cepas europeas producen toxinas ApxII y ApxIII, mientras que las canadienses (y estadounidenses) solamente producen ApxII. Sin embargo, no está completamente claro si tal diferencia puede explicar la falta de virulencia. Por otro lado, las cepas con el serotipo 4 se describen como altamente virulentas en España y no tanto en el resto de países. Cuando se compara con dos cepas del mismo serotipo aisladas de animales clínicamente sanos en Canadá (los únicos aislamientos recuperados en América del Norte hasta ahora), no se detectan diferencias en relación con la producción de toxinas o características antigénicas (observaciones no publicadas). Sin embargo, las infecciones experimentales simultáneas con ambos tipos de cepas todavía no se han realizado. Por último, las cepas con el serotipo 15 son clínicamente importantes en Australia, pero se aíslan con menor frecuencia en otros países, como Canadá, los EE. UU., México, Japón o Brasil. Hay serotipos que en la mayoría de los países se consideran de baja o modera-

Tabla 2. Ejemplos de la variabilidad en la virulencia de las cepas de APP que pertenecen al mismo serotipo aislado a partir de diferentes localizaciones geográficas.

Serotipo	Origen	Virulencia
2	Europa/Canadá	alta/baja
4	España/Canadá	alta/baja
15	Australia/otros	alta/moderada
8	UK/Canadá	alta/moderada

da virulencia (serotipos 3, 10, 14). Los serotipos 10 y 14 no se recuperaron casi nunca de los animales enfermos. El serotipo 3 debería considerarse como un serotipo de baja virulencia. La mayoría de las cepas identificadas como serotipo 3 y aisladas de casos clínicos en el pasado, fueron más recientemente identificadas como serotipo 8. De hecho, prácticamente el verdadero serotipo 3 es muy raramente aislado de casos clínicos [4, 5]. Por último, aunque la mayoría de las cepas de un serotipo determinado en un área geográfica específica tendrían un potencial de virulencia similar, pueden ocurrir algunas excepciones. Genéticamente se demostró que algunas cepas de serotipo 1 aisladas de animales sanos de granjas que no presentaban signos clínicos de pleuroneumonía eran incapaces de producir enfermedad tras la infección experimental de los animales susceptibles (observaciones no publicadas).

UNA SOLA CEPA PUEDE CAUSAR PROBLEMAS CLÍNICOS EN UNA PIARA PERO NO EN OTRA

En algunos aspectos APP sigue siendo un misterio. El problema es predecir cuándo se pueden desarrollar los problemas clínicos en una piara infectada subclínicamente, que es también una de las razones por las que todavía hay problemas con APP hoy en día. El aislamiento de una cepa que pertenece a un serotipo virulento en animales portadores sanos no significa que la cepa no sea virulenta. Usemos un ejemplo: un multiplicador serológicamente positivo para un serotipo virulento (pero libre de infección clínica y sin lesiones típicas en el matadero) que vende animales a una piara convencional conocida libre de este serotipo. Si los signos clínicos aparecen en el rebaño convencional... ¿Podemos sospechar que la cepa es la misma que está presente en el multiplicador, mismo si en este último no induce signos clínicos? En realidad no es fácil de probar, pero es posible tener una cepa que no cause ningún signo clínico o lesiones en un rebaño pero que esté creando problemas en otros rebaños con un estado sanitario distinto y/o que utiliza un sistema de manejo diferente.

Estado sanitario de la explotación

Como tal, la enfermedad APP puede estar directamente relacionada con las condiciones de la piara. Antes hemos

mencionado que las cepas del serotipo 2 de América del Norte son en general, no virulentas. En Canadá tenemos, una o dos veces al año, la enfermedad clínica en los rebaños convencionales causada por cepas del serotipo 2. Estas cepas también producen una sola toxina, similar a las descritas como no virulentas en una infección experimental. Por otro lado, los serotipos de relativamente baja virulencia (como el serotipo 12) a menudo causan la enfermedad en rebaños con un alto estado de salud, libres de infecciones más importantes, pero con mucha menos frecuencia en los rebaños convencionales ya infectados por otros agentes patógenos, incluidos otros serotipos de APP y *A. suis*. Puede emitirse la hipótesis de que en esos rebaños, los animales tienen niveles relativamente altos de anticuerpos contra las toxinas (producidas por otro APP o *A. suis*) que tal vez protegen a los animales frente a las cepas de baja virulencia. Así, en los rebaños convencionales, los serotipos virulentos pueden utilizar infecciones concomitantes para inducir la enfermedad, pero en rebaños de alto estado sanitario, la ausencia de otros microorganismos puede predisponer a los animales, que son más susceptibles a los serotipos menos virulentos. Sin embargo, esto es sólo una hipótesis y no todo es claro y comprensible en lo que a este patógeno se refiere.

DETECCIÓN DE ANIMALES INFECTADOS SUBCLÍNICAMENTE

La serología es el método de diagnóstico más rentable para identificar animales infectados subclínicamente por APP [1].

Originalmente, la fijación del complemento se utilizó en gran medida, pero se ha abandonado en la mayoría de los países debido a su baja sensibilidad y especificidad. Esta prueba sigue siendo necesaria, curiosamente, por la República Popular de China para importar animales vivos en su territorio [6]. Actualmente, las pruebas ELISA son muy utilizadas y hay dos tipos de pruebas serológicas:

- Las que son serotipo/serogrupo específicas basadas en la cadena O del LPS [7].
- Las que detectan todos los serotipos de APP (sin discriminación entre los serotipos) basados principalmente en la toxina ApxIV [8].

El LPS-ELISA es la prueba más conocida y mejor estudiada para medir los anticuerpos frente a los serotipos específicos o serogrupos de APP: 1/9/11; 2, 3/6/8/15; 4/7; 5, 10, 12, 13 y 14 y que ha sido ampliamente utilizado en América del Norte, Dinamarca y Francia. Están disponibles, al menos, dos *kits* comerciales. Por otro lado, ApxIV, una toxina específica para APP, se ha utilizado en la prueba ELISA para detectar anticuerpos frente a todos los serotipos. También hay disponible un *kit* comercial. Se ha sugerido que los animales infectados subclínicamente por APP (en ausencia de signos clínicos) pueden inducir niveles bajos de anticuerpos frente a las toxinas [9]. De hecho, recientemente se reportó una sensibilidad relativamente baja para esta prueba [6]. Se demostró que el nuevo método de fluorescencia basado en inmunoensayo con microsferas que utiliza el mismo antígeno posee mayor sensibilidad que la prueba ELISA [10].

La detección de anticuerpos por ELISA de LPS y ApxIV frente a serotipos/sero-



Consolidación pulmonar en un cerdo afectado por *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

ARTÍCULOS

grupos específicos y todos los serotipos de APP, respectivamente, son a la vez útiles, pero deben utilizarse adecuadamente. Aunque los resultados falsos positivos se han descrito excepcionalmente [11], los rebaños con un estado de salud alto ya conocidos por ser APP libres pueden decidir utilizar la prueba basada en ApxIV como instrumento de vigilancia. Puede ser la hipótesis de que a pesar de que este antígeno parece presentar menor sensibilidad que el LPS-ELISA [6], una cepa APP que habría sido introducida en un rebaño completamente *naïve* induciría la seroconversión y, dependiendo de la cepa, una seroprevalencia detectable. Bajo estas circunstancias, la prueba ApxIV-ELISA debería aumentar su sensibilidad. Si se observan reacciones positivas en los rebaños, los sólidos datos serológicos que utilizan antígenos de diferentes serotipos de APP deben estar disponibles. De lo contrario, sería muy difícil evaluar el nivel de riesgo de la enfermedad si las reacciones positivas sólo están disponibles por el ApxIV-ELISA, especialmente para los criadores.

CONCLUSIONES

Generalmente, muchos rebaños convencionales se infectan con uno o más serotipos. En algunos rebaños que pasan por diferentes instalaciones, las cerdas pueden estar infectadas por dos serotipos, pero sólo uno de ellos se transmite a la descendencia y se encuentra en animales de cebo-acabado [11]. En estos casos no es útil el uso de la prueba ApxIV, ya que no es capaz de evaluar el riesgo. Como se mencionó anteriormente, para un país es importante tener datos fiables sobre los serotipos más importantes que afectan a los anima-



les clínicamente con el fin de determinar qué serotipos (o serogrupos) deberían, con carácter prioritario, ser probados serológicamente. Por ejemplo, en Francia, los serotipos 2 y 9 son responsables de más del 80 % de los casos clínicos de pleuropneumonía. En ese país la vigilancia serológica se dirige principalmente hacia los dos serotipos (LPS-ELISA), y en este momento no sería útil utilizar una prueba para todos los serotipos. De hecho, un estudio mostró que 15 explotaciones francesas dieron positivo con la prueba ApxIV pero fueron negativas con el LPS-ELISA para los se-

rotipos 2 y 1/9/11; de hecho, se demostró que estaban infectados por los serotipos 3/6/8/15; 7/4; 5; 10 y/o 12, la mayoría de ellos considerados como de riesgo relativamente bajo para las piaras convencionales [11]. El reciente desarrollo de un inmunoensayo fluorométrico multiplexado basado en microesferas, que sería realizar la serología para todos los serotipos de APP, pero la identificación del serotipo implicado, sería una herramienta de diagnóstico muy interesante [12, 13]. Todavía hay que realizar pruebas adicionales y una validación completa de esta tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

- Gottschalk M., 2012. Diseases of Swine. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp. 653-659.
- Gottschalk M. The challenge of detecting herds subclinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. J. 2015. In press.
- MacInnes J. *et al.* 2008. Canadian Journal of Veterinary Research. 72, 242-248.
- Zhou L. *et al.* 2008. Journal of Clinical Microbiology. 46, 800-803.
- Gottschalk M. y Lacouture S., 2014. Veterinary Record. 174, 452.
- Opriessnig *et al.* 2013. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 25, 61-71.
- Gottschalk M. *et al.* 1994. Veterinary Microbiology. 42, 91-104.
- Dreyfus A., *et al.* 2004. Veterinary Microbiology. 99, 227-238.
- Chiers K. *et al.* 2002. Veterinary Microbiology. 88, 385-392.
- Gimenez-Lirola L.G. *et al.* 2014. Clinical and Vaccine Immunology. 21, 85-95.
- Broes A. y Gottschalk M. 2007. Journal of Swine Health and Production. 15, 264-269.
- Berger S. Proc. European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Congress. 3, 88.
- Caya *et al.* 2014. Proc. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Annual Conference. 57, 188.