



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Actinobacillus pleuropneumoniae: estudio de la inmunidad
maternal mediante ensayos inmunoenzimáticos frente a las toxinas
RTX (Apx I, II, III y IV) y la proteína de membrana OmpA

D. David Espigares Espigares
2024



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Actinobacillus pleuropneumoniae: estudio de la inmunidad maternal mediante ensayos inmunoenzimáticos frente a las toxinas RTX (Apx I, II, III y IV) y la proteína de membrana OmpA

Autor: D. David Espigares Espigares

Director/es: D. Guillermo Ramis Vidal
D. Francisco J. Pallarés Martínez



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. David Espigares Espigares

doctorando del Programa de Doctorado en

Ciencias Veterinarias

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Actinobacillus pleuropneumoniae: estudio de la inmunidad maternal mediante ensayos inmunoenzimáticos frente a las toxinas RTX (Apx I, II, III y IV) y la proteína de membrana OmpA

y dirigida por,

D./Dña. Guillermo Ramis Vidal

D./Dña. Francisco J. Pallarés Martínez

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 12 de septiembre de 2024

**ESPIGARES
ESPIGARES DAVID**

Firmado digitalmente por
ESPIGARES ESPIGARES DAVID

Fecha: 2024.09.12 19:18:15
+02'00'

Fdo.: David Espigares Espigares

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flórestas, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Non est ad astra mollis e terris via
(Séneca)

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento que tanto había esperado, sentarme a escribir los agradecimientos, lo cual implica que mi tesis doctoral ha llegado a su fin. Una vez en este punto, lo justo es comenzar por mis directores de tesis, a los que tengo que agradecer todo su apoyo y ayuda durante este proceso. Por un lado, a Francisco José Pallarés, ya que gracias a él se produjo el primer acercamiento y fue quien me dio la oportunidad y la confianza necesarias para comenzar con este proyecto. Por otro lado, a Guillermo Ramis, a quien recordaba de mis comienzos como veterinario siendo un compañero en el campo, posteriormente como un investigador con el que pude colaborar en algunos proyectos profesionales, y por azar del destino, más tarde se convirtió en uno de mis directores de tesis, estando a mi lado, prestándome su apoyo y ayuda durante todo el camino. Y durante ese camino, descubrí al que se ha convertido en uno de mis mejores amigos, con quien en estos años de doctorado he compartido penas y alegrías, y del que nunca va a dejar de sorprenderme su capacidad para ver el lado positivo de las cosas y de la vida. Definitivamente, el mundo necesita de más personas como tú, que irradian felicidad por donde pasan, sin dejar a nadie indiferente.

También tengo que agradecer a todos los alumnos, becarios y técnicos de la unidad docente de cría y salud animal, siempre dispuestos para venir a granja conmigo, ayudando en todo lo necesario tanto en la granja como en el laboratorio. En especial a Eli, mi más fiel colaboradora en la fase de granja, con su desparpajo, claridad de ideas, orden y ganas de trabajar, gracias a ella todas las muestras estaban siempre bien ordenadas y a punto, mucha suerte por Francia, se han llevado a una gran veterinaria. Y, por otro lado, también mi más profundo agradecimiento a Fran, Clara, Ángeles y especialmente a Amanda, que han estado siempre ahí con todas las dificultades para poner a punto las técnicas, y que han repetido todas las placas que fueron necesarias, estando siempre dispuestos a colaborar en todo lo que les he pedido, que no ha sido poco.

Y ya que estamos en la Universidad, como no voy a acordarme de Carlos Martínez-Carrasco, mi mentor, quien desde que era un estudiante de veterinaria me iluminó el camino, con su honestidad e integridad profesional, y aunque probablemente él no sea consciente de ello, siempre ha sido el espejo donde mirarme. Jamás podré olvidar el orgullo que pude sentir, varios años después de licenciarme, al ver mi ficha de alumno aún colgada en tu despacho.

Gracias a la empresa Agropor, por permitirme entrar en sus granjas para llevar a cabo este trabajo, en especial gracias a Paula Sánchez, Juan Conesa, Álvaro Guerrero y Anselmo Martínez,

por darme todas las facilidades y ayudarme cada vez que lo he necesitado a lo largo de estos años.

Agradecer también a María Jose Martínez-Aleson de Seysa, Victor Geurts de Biochek y a María Casas de Ovislab por facilitarme el procesado de muestras con los kits de diagnóstico comercial y estar atentos a mis demandas de información.

Y como no, a la familia de Ceva Salud Animal, comenzando por todos y cada uno de los jefes que he tenido, desde Marta Carmona, quien fue la primera que apostó por mí y me dio la oportunidad de subir al barco de Ceva, pasando por Alberto Llop, Miguel Ángel Sos y Rafael Pedrazuela. A todos y cada uno de ellos le agradezco la confianza mostrada desde el primer día, y toda la ayuda que me han prestado en los proyectos que he emprendido en la compañía, entre ellos, esta tesis doctoral. Y, sobre todo, porque es algo que no se puede pagar con dinero, todo lo que he podido aprender de ellos. A todos mis compañeros de la unidad de porcino de Ceva Salud Animal en España durante estos años: Ana, Javi, Héctor, Félix, Juan, Mayte, Jacinto, Paloma, Inma, Luísmá, Pedro, Fernando, Ledi, Begoña, Esther, Adam, Josep, Juan Carlos, Eulogio y Mónica con los que he podido compartir mil y una aventuras, anécdotas, buenos y malos momentos durante todos estos años, pero que siempre han confiado en mí. Y me dejo para el final, no por ser menos importantes, sino por ser quienes más me han soportado a lo largo de este proyecto, a los miembros del equipo técnico durante estos años, del que me siento orgulloso de coordinar: Sonia Cárceles, Laura Garza, Salvador Oliver, Carlos Casanovas, Pablo del Carmen y Susana Mesonero, grandísimos profesionales todos ellos, de los que no dejo de aprender ni un solo momento, y que son los responsables de que haya podido mejorar y ampliar mis conocimientos día tras día para estar a su altura. From the Corporate and R&D team, I am very grateful to Han Smits, Preben Mortensen and Istvan Kiss, helping and supporting me with this project.

A Marcelo Gottschalk, por toda su confianza y ayuda en este proyecto, por acogerme en Montreal como en casa, por siempre tener una buena respuesta o idea para todas mis dudas, por ser un maestro y enseñarme todo lo que he aprendido de *A. pleuropneumoniae*. Thanks to Sonia Lacouture, for your patience teaching and showing me how to work in the lab, and for taking care of me during my stage at the Montreal University.

Y dejo para el final las que son las personas más importantes de mi vida, mi familia. En primer lugar, a Carmen, quien me ha soportado durante todas las etapas de este proyecto, apoyándose en los buenos y en los malos momentos, siempre con la más absoluta comprensión y con una

sonrisa, en la mesa de al lado, dándome las fuerzas necesarias para seguir adelante. Al final ambos hemos conseguido nuestro objetivo. Gracias por sacarme a bailar.

Por más que me empeñe, no tendré tiempo en esta vida para agradecer a mis padres, Cayetano y María, todo lo que han hecho y hacen por mí. Todas las enseñanzas que me han transmitido, todo lo que han luchado a lo largo de su vida y todos los esfuerzos que han realizado por mi espero que hayan merecido la pena. Sin la más mínima duda, todo lo que soy se lo debo a ellos. Es muy fácil actuar en el circo de la vida, sabiendo que tienes una red debajo que te recoge cuando caes.

Por último, a Alejandro, mi hijo, porque si por alguien emprendí este proyecto, fue por él, para enseñarle el camino del esfuerzo, del estudio y de la ciencia, y al igual que hicieron mis padres conmigo, tratar de mostrarle una luz que le pueda ayudar a desenvolverse en la vida. Y, sobre todo, os pido perdón a los cuatro, porque todo el tiempo que le he dedicado a esta tesis, no os lo he podido dedicar a vosotros.

LISTADO DE ABREVIATURAS

24h	24 horas de vida
A.	<i>Actinobacillus</i>
<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
<i>A. suis</i>	<i>Actinobacillus suis</i>
ADCC	Citotoxicidad mediada por células anticuerpo dependiente
ADV	Virus de la enfermedad de Aujeszky
AFLP	Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados
AMR	Resistencias antimicrobianas
APP	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Apx	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> toxin
ApxI+	Lechones con anticuerpos maternos frente a la toxina ApxI a las 24 horas de vida
ApxI-III	Toxinas ApxI, ApxII y ApxIII
ApxI-IV	Toxinas ApxI, ApxII, ApxIII y ApxIV
CD	Clúster de diferenciación
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CN	Densidad óptica control negativo
CP	Densidad óptica control positivo
CPS	Polisacáridos capsulares
CRP	Proteína C Reactiva
CRP	Complejo respiratorio porcino
DIVA	Differentiating Infected from vaccinated animals
DO	Densidad óptica

ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FMIA	Inmunoensayo de fluorescencia con microesferas multiplex
GMD	Ganancia media diaria
Hp	Haptoglobina
HtrA	Heat temperature requirement A
Id	Identificación
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
Índice PABAK	índice kappa ajustado por sesgo y prevalencia
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
LC-MS-MS	Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem
LPS	Lipopolisacáridos
MCS	Modelo de simulación de Monte Carlo
MDA	Anticuerpos de origen maternal
MLV	Vacuna viva atenuada
MPC	Concentración preventiva de mutantes
MSW	Ventana de selección de mutantes
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos
NLR	Receptor tipo Nod
Oml	Lipasa de la membrana externa
Omp	Proteína de la membrana externa
OmpA	Proteína de la membrana externa A
OMV	Vesículas de la membrana externa

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCV2	Circovirus porcino tipo 2
PD	Farmacodinámica
PFA	Proteínas de fase aguda
PGA	Poli-N-acetilglucosamina
PigMAP	Proteína de fase aguda principal del cerdo
PK	Farmacocinética
PRRS	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino
QTL	Loci de rasgo cuantitativo
r	Coefficiente de correlación
R ²	Coefficiente de determinación
RLR	Receptor tipo Rig
RPA	Amplificación de la recombinasa polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
r _s	Coefficiente de correlación de Spearman
RTX	Repeats in toxin
SAA	Amiloide sérico A
SEM	Semana
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
swIAV	Virus de la influenza porcina
T1SS	Sistema de secreción tipo 1
TAA	Adhesina trimérica autotransportadora
Tbp	Proteína captadora de transferrina
Th	Linfocito T colaborador
TLR	Receptor tipo Toll

TMB	Solución de cromógeno
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
WGS	Secuenciación de genoma completo

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	5
LISTADO DE ABREVIATURAS	11
TABLA DE CONTENIDO	17
1. INTRODUCCIÓN	21
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. La pleuroneumonía porcina	25
2.1.1. Etiología	25
2.1.2. Epidemiología	31
2.1.3. Patogenia	36
2.1.4. Inmunología.....	45
2.1.5. Cuadro clínico	48
2.1.6. Lesiones	52
2.1.7. Diagnóstico	55
2.1.8. Tratamiento	64
2.1.9. Inmunoprofilaxis	71
2.2. La inmunidad maternal frente a <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	77
2.2.1. La inmunidad de origen maternal en el lechón.....	77
2.2.2. La inmunidad maternal frente a <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	79
2.2.3. Interacción vacunal con la inmunidad maternal	81
3. OBJETIVOS.....	89
3.1. Objetivos primarios	89
3.2. Objetivos secundarios	89
4. MATERIAL Y MÉTODOS	93
4.1. Selección de las granjas.....	93
4.2. Selección de los animales.....	95
4.3. Manejo de los animales	96
4.4. Toma de muestras	97
4.5. Evaluación clínica.....	98
4.6. Procesado de las muestras.....	99
4.7. Pruebas ELISA Apx I, II y III	99
4.8. Prueba ELISA ApxIV	104
4.9. Prueba ELISA OmpA.....	104
4.10. Análisis estadístico	105
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111

5.1. Resultados serológicos de las cerdas	111
5.1.1. Diagnóstico previo para detección de anticuerpos frente a toxina Apx IV	111
5.1.2. Serología para detección de anticuerpos específicos de serotipo.....	111
5.1.3. Serología para detección de anticuerpos frente a toxinas ApxI, ApxII, ApxIII, Apx IV y proteína OmpA	112
5.2. Cultivo y determinación de serotipo en cebo	113
5.3. Evaluación clínica lechones Grupo A	114
5.4. Resultados serológicos lechones Grupo A.....	114
5.4.1. Resultados prueba serológica Apx I grupo A.....	115
5.4.2. Resultados prueba serológica Apx II grupo A.....	126
5.4.3. Resultados prueba serológica Apx III grupo A.....	132
5.4.4. Resultado prueba serológica Apx IV grupo A	139
5.4.5. Resultado prueba serológica OmpA grupo A	144
5.5. Resultados pruebas serológicas ApxI, II, III, IV y OmpA a las 18 semanas grupo A	151
5.6. Resultados serológicos lechones Grupo B	153
5.7. Estudio la concordancia entre las 5 pruebas de ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de positivos a <i>A. pleuropneumoniae</i> mediante la detección de anticuerpos frente a las toxinas ApxI-III, ApxIV y la proteína OmpA.....	157
6. DISCUSIÓN	159
7. CONCLUSIONES.....	177
8. RESUMEN	181
9. ABSTRACT	185
10. BIBLIOGRAFÍA	189
11. ANEXOS	231

1. INTRODUCCIÓN

La pleuroneumonía porcina ocasionada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) es una enfermedad infectocontagiosa, de carácter respiratorio y distribución mundial que afecta al ganado porcino, pudiendo ocasionar brotes agudos con una alta tasa de mortalidad, lo que conlleva importantes pérdidas económicas para las granjas afectadas, así como un incremento asociado en el consumo de antibióticos, con la repercusión que este hecho puede tener asociado desde el punto de vista de la generación de resistencias (Sassu et al., 2018).

Diversos estudios han sugerido que la presencia en los lechones de anticuerpos de origen maternal frente a esta bacteria, están relacionados con la protección frente a la enfermedad durante las primeras etapas de su vida productiva (Chiers et al., 2002a; Nechvatalova et al., 2005; Nielsen, 1975, 1995; Vigre et al., 2002), no obstante, aún está por clarificar la duración de algunos de estos anticuerpos maternos, así como algunas de sus implicaciones.

Por otro lado, en el contexto actual de reducción en el uso de antibióticos bajo una perspectiva One Health, las pautas preventivas mediante vacunación frente a enfermedades bacterianas, entre las cuales se encuentra la pleuroneumonía porcina, están cobrando gran importancia, tanto en lo que se refiere al desarrollo de nuevas vacunas y nuevas pautas de vacunación, como a maximizar la eficacia de las actualmente disponibles, así como a incrementar el conocimiento de aquellos factores que puedan interferir con el desarrollo de una buena respuesta inmunitaria a las vacunas aplicadas.

En el caso específico de la pleuroneumonía porcina ocasionada por *A. pleuropneumoniae*, actualmente hay disponibles diferentes tipos de vacunas frente a la enfermedad: bacterinas a base de determinados serotipos inactivados de la bacteria, vacunas de subunidades con las toxinas Apx, así como vacunas que incluyen tanto la bacterina frente a determinados serotipos como las toxinas Apx. En todos los casos, si bien se ha sugerido que existe una posible interacción de las vacunas disponibles con la inmunidad maternal, aún quedan lagunas de conocimiento por rellenar respecto a dicha interacción.

Así pues, se considera necesario determinar la evolución de los anticuerpos maternos frente a las diferentes toxinas Apx en lechones procedentes de cerdas seropositivas en condiciones de campo, para conocer cómo podrían afectar tanto a la protección frente a la enfermedad en edades tempranas, como a la interacción con vacunas, de manera que en base a estudiar estos niveles de anticuerpos se puedan optar por aquellos protocolos vacunales más eficientes.

Por tanto, en este estudio se pretende medir la evolución de los anticuerpos maternos específicos frente a las toxinas Apx I, II y III de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en lechones procedentes de reproductoras seropositivas, desde el nacimiento hasta las 10 semanas de vida, mediante una prueba serológica desarrollada a tal efecto, así como comparar su evolución con los anticuerpos frente a la toxina ApxIV y frente a la proteína de la membrana externa A (OmpA) de la bacteria, medidos ambos con kits de diagnóstico comerciales y la correlación entre estas pruebas serológicas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La pleuroneumonía porcina

2.1.1. Etiología

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pleuropneumoniae* o APP), agente etiológico de la pleuroneumonía porcina, fue aislado por primera vez en el año 1957 en Gran Bretaña (Pattison et al., 1957), inicialmente nombrado como *Haemophilus pleuropneumoniae* (Shope, 1964) y posteriormente incluido en la familia *Pasteurellaceae* y en el género *Actinobacillus* (Pohl. et al., 1983).

A. pleuropneumoniae es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, de pequeño tamaño, con morfología cocobacilar, encapsulada e inmóvil. Los aislados de APP se clasifican en función de sus requerimientos de β -Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD) para crecer in vitro como biotipo (o biovar) 1 (NAD dependientes) o biotipo 2 (NAD independientes, es decir, son capaces de sintetizarlo en presencia de sus precursores) (Pohl. et al., 1983). En ambos biotipos se pueden encontrar cepas virulentas, por lo que la capacidad de síntesis de NAD no está relacionada con la virulencia (Dom & Haesebrouck, 1992).

Han sido descritos 19 serovares o serotipos en función de la composición de sus polisacáridos capsulares (Bossé et al., 2018b; Sárközi et al., 2015; Stringer et al., 2021a), con diferencias antigénicas y de virulencia entre ellos (Haesebrouck et al., 1997).

Estos polisacáridos capsulares (CPS) consisten en un polímero de oligosacáridos repetidos que recubren la bacteria a modo de cápsula (Beynon et al., 1991), presentando propiedades antifagocíticas que la protegen de las defensas del hospedador (Dubreuil et al., 2000).

A. pleuropneumoniae también presenta en su superficie cadenas de lipopolisacáridos (LPS), estos LPS son componentes estructurales esenciales de las bacterias Gram negativas, formados por tres regiones diferenciadas: el lípido A, el núcleo de oligosacáridos y el polisacárido O (o cadena O). Esta estructura completa es la que presentan las formas lisas de la bacteria, denominándose como rugosas las cepas que han perdido la cadena O, pudiéndose también encontrar una forma intermedia, denominada semirrugosa, debido a que sus LPS presentan uno o un bajo número de cadenas O (Dubreuil et al., 2000).

El análisis filogenético del polisacárido O de los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae* muestra que basándonos en la composición de esta molécula los serotipos de esta bacteria se podrían agrupar en 4 subgrupos (To et al., 2024):

- Subgrupo IA que incluye los serotipos 2, 3, 6, 8, 15, 17 y 19.
- Subgrupo IB que incluye los serotipos 4, 7, 13, 18 y 19.
- Subgrupo IIA con los serotipos 1, 9 y 11.
- Subgrupo IIB con los serotipos 5, 10, 12, 14 y 16.

Por otro lado, es reseñable el hecho de que el núcleo de oligosacáridos del LPS presente en *Actinobacillus suis* comparte algunas de las características estructurales del núcleo de oligosacáridos de varios serotipos de *A. pleuropneumoniae*, lo que tiene como consecuencia la detección de reacciones serológicas cruzadas entre ambas bacterias (Ganeshpillai et al., 2011).

Además de los polisacáridos capsulares y lipopolisacáridos, *A. pleuropneumoniae* posee otros componentes relacionados con su capacidad de colonización, persistencia e inducción de lesiones en el hospedador, entre los que caben destacar diversas exoproteínas, tal y como ha mostrado su exoproteoma, estudiado mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS), que revela en el serotipo 2 la presencia de 593 exoproteínas, de las cuales 22 estaban relacionadas con la colonización y establecimiento de la infección, 27 estaban relacionadas con la persistencia dentro del hospedador y 23 tenían una función estructural como factores de virulencia, contribuyendo indirecta o directamente a la patogenicidad de la bacteria (Stancheva et al., 2022). Entre estas exoproteínas involucradas en la virulencia de la bacteria caben destacar las proteínas captadoras de hierro (Tbp), varias proteínas de la membrana externa (Omp), entre ellas la proteína de la membrana externa A (OmpA); así como las toxinas Apx, siendo estas últimas las más abundantes dentro del exoproteoma (Chiers et al., 2010; Stancheva et al., 2022). Además, se ha sugerido que algunas de las proteínas excretadas por la bacteria podrían actuar como mediadores de las interacciones entre el hospedador y el patógeno, pudiendo modificar la respuesta inmune de dicho hospedador (Stancheva et al., 2022).

Los biofilms bacterianos son estructuras compuestas por una comunidad de bacterias incluidas en una matriz polimérica producida por ellas mismas y que está adherida a una superficie biótica o abiótica (Jacques et al., 2010; Nesse et al., 2023). *A.*

pleuropneumoniae tiene la capacidad de formar biofilm tanto *in vitro*, como *in vivo* en el pulmón del cerdo (Labrie et al., 2010; Tremblay et al., 2017). El antígeno O del LPS, un exopolisacárido formado por poli-N-acetilglucosamina (PGA), así como diversas proteínas de membrana tipo TolC juegan un importante papel en la formación de este biofilm (Hathroubi et al., 2015; Y. Li et al., 2016c). Una temperatura elevada del hospedador también influye de forma positiva en la formación de biofilm (H. Li et al., 2018). Si bien no todas las cepas de esta bacteria tienen la capacidad de formar biofilm, la mayor parte de los aislados procedentes de tonsila, pulmón y mucosa nasal tienen la capacidad de hacerlo (Aper et al., 2020; Kaplan & Mulks, 2005). Esta capacidad de formar biofilm infiere a la bacteria una mayor resistencia frente a la acción del sistema inmune del hospedador, siendo clave para su colonización y supervivencia, así como una mayor resistencia frente a la acción de los antibióticos (Izano et al., 2007; Nesse et al., 2023; Pereira et al., 2018). Además, se ha sugerido que el metabolismo de la bacteria sufre modificaciones cuando está formando parte de este biofilm, de forma que se activan determinados genes que inducen una mayor síntesis de sustancias que forman parte de la matriz polimérica extracelular, mientras que se reduce la activación de genes relacionados con la virulencia (como las toxinas Apx), lo que tiene como consecuencia una menor virulencia de estos agregados de bacterias en comparación con las que tienen un crecimiento planctónico (Zhang et al., 2023b).

Al igual que otras bacterias Gram negativas, APP también posee la capacidad de liberar al medio extracelular vesículas de la membrana externa (OMVs) (Negrete-Abascal et al., 2000). Estas OMVs son pequeñas partículas originadas a partir membrana externa de la bacteria, por lo que son muy parecidas a esta en estructura y composición, pudiendo contener toxinas Apx (no citotóxicas), proteínas relacionadas con la captación de hierro, diversas proteasas, así como otras proteínas con capacidad antigénica como la OmpA (Negrete-Abascal et al., 2000; Z. Zhu et al., 2022).

2.1.1.1. Toxinas RTX

Las toxinas Repeats in ToXin (RTX), siendo denominadas como Apx las que son producidas específicamente por *A. pleuropneumoniae*, son toxinas bacterianas formadoras de poros, con actividad citolítica y hemolítica, muy abundantes dentro de las especies patógenas de la familia *Pasteurellaceae*, jugando un papel primordial en la virulencia de estas bacterias (Frey, 2011, 2019).

Tabla 1. Actividad de las toxinas Apx

Toxina	Actividad
ApxI	Citotóxica fuerte y hemolítica fuerte
ApxII	Citotóxica moderada y hemolítica débil
ApxIII	Citotóxica fuerte y no hemolítica
ApxIV	No citotóxica y hemolítica débil

Estas toxinas son secretadas mediante un sistema de secreción tipo I (T1SS), que permite una secreción eficiente de las toxinas a través de la membrana interna y externa (Frey, 2019). Los genes que codifican las proteínas del T1SS están localizados junto con los genes estructurales y activador de las toxinas RTX en un operón policistrónico, formando junto con la proteína intrínseca de membrana TolC, el canal de secreción (Frey, 2019). Así pues, la estructura genética básica de las toxinas RTX es característica, e incluye el gen estructural “A”, el gen activador “C” y los genes del T1SS “B” y “D” (pCABD) (Frey, 2019).

La célula diana de la mayor parte de las toxinas RTX son los leucocitos, donde estas toxinas cuando están presentes en altas concentraciones se unen al receptor CD18 (β_2 integrina), expresado exclusivamente por los leucocitos, lo que determina la especificidad de la unión de la toxina por este tipo celular; para posteriormente ejercer la actividad citotóxica, o bien, cuando están presentes en concentraciones bajas (sublíticas), ser transportadas a la mitocondria donde inducen la apoptosis de la célula infectada (Frey, 2011, 2019; Ristow & Welch, 2019).

Para varias de estas toxinas RTX, la unión a estos receptores CD18 ha demostrado ser específica de hospedador, lo que indica el rol determinante que tienen las toxinas Apx en la especificidad de *A. pleuropneumoniae* por el cerdo como hospedador y explica por qué esta bacteria únicamente afecta al ganado porcino (Frey, 2011, 2019).

La virulencia de *A. pleuropneumoniae* está determinada en gran medida por la producción de este tipo de toxinas, concretamente las toxinas Apx I, II, III y IV (Frey et al., 1993; Schaller et al., 1999), cuyas características principales son:

- ApxI. La toxina ApxI es fuertemente hemolítica, así como fuertemente citotóxica para macrófagos alveolares y neutrófilos (Frey et al., 1993; Kamp et al., 1991). Es producida por los serotipos 1, 5, 9, 10, 11, 14 y 16 (Frey et al., 1993; Kamp et al., 1991; Sárközi et al., 2015), presentando

dos variantes, una en los serotipos 1, 9 y 11 y otra en los serotipos 5 y 10, siendo ambas antigénicamente similares (Frey, 1995; Jansen et al., 1993). Esta toxina está codificada por un operón clásico pCABD con su propio T1SS (Frey, 2019).

- ApxII. La toxina ApxII es débilmente hemolítica, así como moderadamente citotóxica para macrófagos alveolares y neutrófilos. Está presente en todos los serotipos, excepto en el 10 y el 14 (Frey et al., 1993; Kamp et al., 1991). El operón que codifica esta toxina, a diferencia de los operones de las toxinas ApxI y III no tiene los genes B y D, así que la toxina ApxII utiliza el T1SS codificado por el gen *apxIBD*, siendo este sistema de secreción capaz de excretar las toxinas ApxI y II (Frey, 2019).
- ApxIII. La toxina ApxIII no tiene capacidad hemolítica, pero sí que muestra una fuerte capacidad citotóxica hacia macrófagos alveolares y neutrófilos. Está presente en los serotipos 2, 3, 4, 6, 8 y 15 (Frey et al., 1993; Kamp et al., 1991). Esta toxina también presenta dos variantes, las cuales son también antigénicamente muy similares (To et al., 2016). La toxina ApxIII al igual que la ApxI está codificada por un operón clásico pCABD con su propio T1SS (Frey, 2019).
- ApxIV. La toxina ApxIV, tiene una débil capacidad hemolítica, sin haberse detectado capacidad citotóxica. Además, es la única que puede ser detectada en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae*, siendo además específica de esta bacteria (Schaller et al., 1999). Se ha reportado como la única de estas toxinas que solamente se produce *in vivo*, no habiéndose detectado su producción en condiciones de crecimiento de la bacteria *in vitro* (Schaller et al., 1999), si bien recientemente se ha llegado a reportar su presencia tras el cultivo *in vitro* de una cepa de la bacteria (Y. Li et al., 2019), así como también ha sido detectada su presencia en un estudio del exoproteoma de una cepa del serotipo 2 de esta bacteria, también cultivada *in vitro*, por lo que se ha sugerido que unas condiciones optimizadas de crecimiento podrían llevar a una producción a gran escala de toxina ApxIV, y teniendo en cuenta que todos los estudios realizados hasta la fecha respecto a la

capacidad citotóxica, hemolítica e inmunogénica de esta toxina se han tenido que realizar con una versión recombinante de la misma, se ha especulado con la posibilidad de que la forma nativa de la toxina presentase unas características diferentes (Stancheva et al., 2022). Por otro lado, a diferencia de las otras toxinas Apx, esta toxina está codificada por un operón bicistrónico apxIVC-apxIVA (Frey, 2019).

Las toxinas ApxI y ApxIII, y en menor medida la toxina ApxII, son las responsables de desencadenar la sintomatología clínica y lesiones pulmonares típicas de la pleuroneumonía porcina (Kamp et al., 1997). Y si bien es necesaria la presencia de al menos una toxina Apx para que una cepa de *A. pleuropneumoniae* sea potencialmente virulenta, se ha sugerido que puede existir cierto efecto sinérgico entre toxinas, o entre toxinas y otros componentes de la bacteria, como LPS (Reimer et al., 1995; Udeze et al., 1987). En este sentido, se ha observado que en serotipos que producen toxinas ApxI y ApxII, como el serotipo 1, es necesaria la presencia de ambas toxinas para que la bacteria sea virulenta y se desarrollen lesiones tras la infección (Boekema et al., 2004a). Por el contrario, la toxina ApxIV por sí sola parece ser incapaz de inducir los síntomas o las lesiones típicos de la enfermedad (Boekema et al., 2004a).

Tanto en infecciones naturales como experimentales, estas toxinas han mostrado ser importantes factores de inmunogenicidad, estando involucradas en la inducción de una protección eficiente frente a la enfermedad (Frey et al., 1993). Y dado que estas toxinas son especie específicas, y son producidas por todos los serotipos, son de gran valor para su uso en vacunas y test serológicos de diagnóstico (Kamp et al., 1994).

Los genes de las toxinas Apx son inherentes a un determinado serotipo, por lo que cada serotipo tiene un patrón específico de producción de toxinas, siendo por tanto el serotipo un indicativo del grado de virulencia de una cepa determinada (Beck et al., 1994; Vilaró et al., 2024). Así pues, los serotipos 1, 5, 9 y 11, debido a su patrón de producción de toxinas, en concreto ApxI y ApxII, son particular y excepcionalmente virulentos (Frey, 1995).

Tabla 2. Patrón de producción de toxinas en cada serotipo de *A. pleuropneumoniae*

	Serotipo <i>A. pleuropneumoniae</i>																		
Toxina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
ApxI	■				■				■	■	■			■		■			
ApxII	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ApxIII		■	■	■		■		■							■				
ApxIV	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Las toxinas ApxI, ApxII y ApxIII no son exclusivas de *A. pleuropneumoniae*, sino que se ha detectado su producción por otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae* como *Actinobacillus suis*, bacteria patógena oportunista que es capaz de producir ApxI y ApxII (Kamp et al., 1994; Schaller et al., 2000); *Actinobacillus porcitonisillarum* que a pesar de no considerarse patógena, es comúnmente aislada de tonsilas de cerdos sanos, siendo capaz de producir toxina ApxII (Gottschalk et al., 2003; Kuhnert et al., 2005); *Actinobacillus lignieresii*, que posee el gen para producir toxina ApxI, si bien no se ha detectado su biosíntesis y es considerada una bacteria no patógena para el cerdo (Schaller et al., 2000); así como *Actinobacillus rossii*, poseedora de los genes de las toxinas ApxII y ApxIII y que es capaz de secretar ApxII, sin haberse detectado secreción de ApxIII, e igualmente considerada no patógena para el cerdo (Schaller et al., 2000). Esta particularidad debe ser tenida en cuenta a la hora de interpretar los resultados de las pruebas serológicas basadas en estas toxinas, dada la posible aparición de reacciones serológicas cruzadas debidas a la presencia de anticuerpos reactivos frente a toxinas Apx producidas por estas otras bacterias (Kamp et al., 1994; Kuhnert et al., 2005; Schaller et al., 2000). Por el contrario, la toxina ApxIV parece ser la única de las toxinas Apx que es específica y únicamente producida *A. pleuropneumoniae* (Schaller et al., 1999).

2.1.2. Epidemiología

2.1.2.1. Distribución geográfica

El reservorio principal de *A. pleuropneumoniae* es el cerdo doméstico (*Sus scrofa domestica*), si bien es detectado con frecuencia en suidos salvajes por todo el mundo (Gottschalk & Broes, 2019; Sárközi et al., 2022). La detección en otras especies de animales se considera un hallazgo anecdótico (Gottschalk & Broes, 2019).

A. pleuropneumoniae ha sido descrito en la mayoría de los países productores de ganado porcino, detectándose una mayor presencia de ciertos serotipos en cada país, que va evolucionando a lo largo del tiempo (MacInnes et al., 2008; Marcelo Gottschalk, 2017; O'Neill et al., 2010; Sassu et al., 2018). Así pues, se ha detectado una predominancia de los serotipos 2, 3 y 9 en Bélgica (Maes et al., 2002); de los serotipos 2 y 9 en Alemania e Italia (Guarneri et al., 2024; Schuwerk et al., 2021); de los serotipos 2, 13, 8 y 16 en Hungría (Sárközi et al., 2018), del serotipo 8 en Inglaterra y Gales (Y. Li et al., 2016b; O'Neill et al., 2010), de los serotipos 2, 4 y 7 en España (Maldonado et al., 2009), así como de los serotipos 5 y 7 en Norteamérica (Gottschalk & Lacouture, 2015), serotipos 2, 6 y 15 en Japón (Ozawa et al., 2023); y serotipos 8, 7 y 5 en Brasil (Kuchiishi et al., 2023).

También se ha observado que la virulencia de un mismo serotipo puede ser diferente según el área geográfica en que se encuentre, como es el caso del serotipo 2, que es considerado virulento en Europa y, sin embargo, poco virulento en Norteamérica, debido a que las cepas allí presentes no producen la toxina ApxIII (Gottschalk, 2015). El hallazgo de cepas de un determinado serotipo que han perdido el gen para la producción de una toxina, con lo que se han tornado en cepas menos virulentas, también se ha observado en el serotipo 15, en el que la falta del gen que codifica para la toxina ApxII, ha motivado la aparición de cepas menos virulentas que la cepa tipo de dicho serotipo (Teshima et al., 2019).

2.1.2.2. Transmisión indirecta

La supervivencia en el medio ambiente de *A. pleuropneumoniae* parece ser limitada, sugiriendo algunos estudios la posibilidad de sobrevivir durante 3-4 días en secreciones nasales, sobreviviendo mejor con temperaturas frías y en presencia de NaCl, así como en ambientes secos, particularmente sobre materiales no absorbentes, lo que sugiere una posible vía de transmisión indirecta a través de fómites (Assavacheep & Rycroft, 2013), así como a través del personal de la granja (Hunneman & Oving, 1991).

También se ha detectado la presencia y viabilidad de la bacteria en agua de bebida de granjas porcinas, pudiendo llegar a sobrevivir en agua durante 3 semanas a 20°C (V. M. Loera-Muro et al., 2013), sugiriéndose que para ello *A. pleuropneumoniae* posee la capacidad de integrarse y formar biofilm junto con otras especies bacterianas presentes en el medio ambiente de las granjas, como *Escherichia coli* (*E.*

coli), lo cual le permite incrementar la supervivencia fuera de su hospedador natural, actuando como un mecanismo de persistencia y transmisión dentro de la granja (Ramírez-Castillo et al., 2018).

En cuanto a la transmisión vía aerógena, si bien *A. pleuropneumoniae* ha podido ser detectado y aislado a partir de aerosoles dentro de granjas comerciales (Watt et al., 2020), y se ha reportado su posible transmisión a través de esta vía (Hunneman & Oving, 1991), la transmisión por esta vía parece que únicamente se produce a distancias muy cortas (Torremorell et al., 1997), siendo la transmisión entre instalaciones adyacentes un acontecimiento raro (Kristensen et al., 2004b).

También se ha observado una supervivencia superior a 4 meses a temperaturas de -20°C, lo que sugiere una larga persistencia en canales de cerdo congeladas (Assavacheep & Rycroft, 2013).

Una investigación epidemiológica de brotes ocasionados por el serotipo 15 de *A. pleuropneumoniae* en Iowa puso de manifiesto el importante rol que juegan las medidas de bioseguridad, interna y externa, en las granjas para evitar la entrada o diseminación de este patógeno, poniendo un especial énfasis en los cambios de botas entre salas, limpieza y desinfección de camiones de transporte de animales, entrada de vehículos, herramientas y personas a la granja, así como en el peligro que representan los camiones de transporte de cadáveres (Machado et al., 2024).

En definitiva, si bien la transmisión indirecta es un hecho infrecuente, esta ha sido reportada como el hecho más probable en algunos casos clínicos a nivel de granja, en los que la transmisión indirecta fue la causa más probable de la infección en los animales (Desrosiers & Moore, 1998), considerándose por tanto la entrada de animales portadores infectados la principal vía de transmisión entre rebaños (Gottschalk & Broes, 2019).

2.1.2.3. Transmisión directa

A. pleuropneumoniae se transmite fundamentalmente a través de contacto directo nariz-nariz, siendo esta la ruta de transmisión más importante, o bien en pequeñas distancias a través de aerosoles (Kristensen et al., 2004b; Tobias et al., 2014a; Velthuis et al., 2003).

Una vez que los animales han sido infectados, pueden permanecer como portadores subclínicos de la bacteria a nivel de las tonsilas (Chiers et al., 1999). Esta colonización

de las tonsilas, y su posterior excreción desde las mismas, es clave para la transmisión de *A. pleuropneumoniae*, ya que la presencia de la bacteria en la tonsila está relacionada con el estatus de infeccioso (Velthuis et al., 2002), lo que da lugar a que la transmisión entre granjas se produce principalmente a través de la entrada de estos animales como portadores tonsilares subclínicos (Gottschalk & Broes, 2019; Rosendal & Mitchell, 1983).

En cuanto a la transmisión dentro de una granja, las cerdas reproductoras portadoras de *A. pleuropneumoniae* a nivel tonsilar, son las transmisoras a sus camadas durante el periodo de lactación, dando lugar a lechones que se infectan una vez que los niveles de anticuerpos maternos comienzan a decaer, pudiendo detectarse animales infectados a partir del día 11 de vida (Vigre et al., 2002).

Aunque la colonización del tracto respiratorio superior del lechón se puede producir aun en presencia de inmunidad maternal, la colonización de los pulmones no se observa hasta varias semanas después (Chiers et al., 2002b).

A pesar de que una gran parte de las reproductoras puedan ser portadoras de *A. pleuropneumoniae*, la transmisión no se produce por igual a todos los lechones, pudiendo permanecer aproximadamente un 40% de las camadas aún libres de la bacteria al momento del destete, detectándose además dentro de las camadas infectadas una mayor parte de los lechones aún sin colonizar (Tobias et al., 2014b). Así pues, durante el periodo de lactación, solamente unos pocos lechones son infectados por parte de sus progenitoras, y estos lechones son los responsables de la transmisión horizontal al resto de animales durante las fases de transición y cebo, detectándose un pico de transmisión entre las semanas 6 y 12 de vida (Vigre et al., 2002).

Debido a todo esto, la edad al destete de los lechones es un factor asociado positivamente a la probabilidad de infectarse en la fase post-destete (Tobias et al., 2014a).

Se ha sugerido que esta transmisión horizontal se produce de forma más intensa (diez veces más) entre compañeros de la misma cuadra (transmisión directa a través de contacto nariz-nariz), que entre cuadras adyacentes (transmisión indirecta a través de aerosoles), no detectándose diferencias en la transmisión entre cuadras adyacentes o no adyacentes. (Tobias et al., 2014a). Por este motivo, la mezcla de camadas en la fase post destete resulta en un incremento de los lechones expuestos

a la transmisión dentro de la cuadra, lo cual se traduce en un incremento en la prevalencia de animales infectados, en comparación a si los lechones hubiesen sido alojados manteniendo las camadas sin ser mezclados (Tobias et al., 2014a).

Una vez se desencadenan los signos clínicos de la enfermedad en un animal, se ha sugerido que este podría reducir la transmisión de la bacteria, ya que los animales con sintomatología aguda o hiperaguda reducen el contacto con sus compañeros de cuadra, así pues, los animales con una sintomatología más severa transmitirían el patógeno de una forma menos eficiente (Tobias et al., 2013).

2.1.2.4. Factores de riesgo

Los brotes de *A. pleuropneumoniae* en granjas endémicamente infectadas están probablemente iniciados por un factor desencadenante, que modifica la interacción entre patógeno y hospedador en animales previamente infectados (Klinkenberg et al., 2014).

En un modelo matemático llevado a cabo a cabo por Klinkenberg et al. para el estudio de los mecanismos por los que se desencadenan los brotes de la enfermedad, se sugirió que el tamaño de los brotes puede estar relacionado con el número de cerdos colonizados susceptibles presentes durante los factores desencadenantes del brote, así los brotes son pequeños cuando se producen a una edad temprana, y más grandes cuando se producen a partir de una edad de 10-12 semanas (Klinkenberg et al., 2014); si bien este mismo estudio también sugiere que en casos en los que la enfermedad se desarrolla por una elevada tasa de transmisión de la bacteria, el tamaño de los brotes puede estar relacionado con el número de cerdos susceptibles presentes (colonizados y no colonizados), así como por el número de animales protegidos por la inmunidad materna que van perdiendo dicha inmunidad durante el desarrollo del brote (Klinkenberg et al., 2014).

Dentro de un mismo sistema de producción, mediante estudios genómicos, se ha podido observar como este patógeno se transmite de forma vertical a lo largo de los diferentes niveles de producción (Guitart-Matas et al., 2022; Vilaró et al., 2024). Por ello, la adquisición de cerdas de reposición a partir de más de un origen diferente, así como unas medidas de bioseguridad deficientes en la granja, se consideran factores de riesgo para la infección por *A. pleuropneumoniae* (Maes et al., 2001; Vilaró et al., 2024). Esto también da lugar a que sea un hallazgo común la coexistencia de múltiples serotipos de *A. pleuropneumoniae* dentro de una misma

granja, estando muchas de estas granjas infectadas de forma subclínica (Maes et al., 2001).

También se ha postulado que los lechones procedentes de cerdas primerizas pueden estar más expuestos a *A. pleuropneumoniae* que los procedentes de cerdas multíparas, posiblemente debido a una inferior calidad del calostro y por tanto una peor inmunidad pasiva (Fitzgerald et al., 2020). También se ha observado que no mantener un flujo unidireccional por edad de los lechones, no mantener una política estricta todo dentro – todo fuera, mantener elevadas densidades, así como no realizar vacíos sanitarios entre lotes incrementa el riesgo de infección por parte de los animales en crecimiento (Fitzgerald et al., 2020; Galdeano et al., 2019). De igual modo, también ha sido descrito que la producción segregada por fases tiene un efecto profiláctico sobre la infección por *A. pleuropneumoniae* de los animales en crecimiento (Holmgren et al., 1999).

Por otro lado, diversos estudios han sugerido como factores de riesgo para el desarrollo de brotes clínicos de la enfermedad, unas pobres condiciones de alojamiento, en especial aquellas relacionadas con la ventilación, la humedad, la temperatura y la concentración de gases como amoníaco y dióxido de carbono; una elevada densidad de animales, así como la estacionalidad, detectándose diferentes niveles de seroprevalencia o afectación clínica en función de la época del año (Beskow et al., 1998; Maes et al., 2001; Rosendal & Mitchell, 1983).

Mediante una estimación a partir de un modelo matemático, también se ha insinuado que unos protocolos de limpieza y desinfección ineficientes podrían causar sustanciales pérdidas económicas debido a un peor control de la enfermedad, pudiendo alcanzar los 20,2 euros por plaza al año, lo que muestra la importancia de la limpieza y la desinfección dentro del contexto actual de reducción en el uso de antimicrobianos, con vacunas que no proporcionan una protección total frente a la enfermedad (Stygar et al., 2016).

2.1.3. Patogenia

Se considera que hay 3 etapas básicas durante la patogénesis de la pleuroneumonía porcina: colonización, evasión de los mecanismos de defensa y daño a los tejidos del hospedador (Bossé et al., 2002).

2.1.3.1. Colonización

Una vez que la bacteria penetra vía oro-nasal en el hospedador, ésta se adhiere al epitelio de la superficie tonsilar o a los componentes de la matriz extracelular, lo que se podría considerar como el primer paso para el establecimiento de la infección, para en fases más tardías, localizarse principalmente en las paredes o en el fondo de las criptas tonsilares, donde se establece una infección crónica que da lugar a un estado de portador asintomático en el animal (Chiers et al., 1999; Hernández-Cuellar et al., 2022). En esta fase temprana de la infección, *A. pleuropneumoniae* también invade las glándulas salivares, así como la cavidad nasal (Sassu et al., 2017a; Sidibé et al., 1993), posee la capacidad de atravesar el epitelio respiratorio traqueal mediante la destrucción de las proteínas de uniones estrechas (Bercier et al., 2019), así como la capacidad de adherirse al contenido mucoso del tracto respiratorio (Belanger et al., 1994). También se ha observado la adhesión a los cilios de los bronquiolos terminales y a las células epiteliales de los alveolos, sugiriéndose que la bacteria se une preferencialmente al epitelio del tracto respiratorio inferior (Dom et al., 1994). Teniendo en cuenta todo lo anterior, se ha sugerido que en función de la naturaleza del material infeccioso que penetre en el animal (gotas de aerosol o secreciones mucosas), la colonización primaria se puede establecer en el tracto respiratorio superior o inferior, debido a que las partículas de aerosol generadas en los estornudos y tos son lo suficientemente reducidas como para penetrar directamente en el tracto respiratorio inferior, obviando la necesidad de colonización del tracto respiratorio superior (Bossé et al., 2002).

A pesar de ser un microorganismo encapsulado, se ha sugerido que los LPS son accesibles en la superficie de la bacteria, pudiendo jugar un importante papel en su adhesión a las células del aparato respiratorio, en concreto a las células epiteliales de la tráquea, al endotelio vascular y al mesénquima pulmonar (Belanger et al., 1990; S. E. Paradis et al., 1994; Ramjeet et al., 2005), así como a las secreciones mucosas presentes en el árbol respiratorio (Belanger et al., 1994). Este papel es llevado a cabo mediante la fracción del polisacárido del LPS (cadena O), que es la región responsable de la adherencia de *A. pleuropneumoniae* a varias secuencias de sacáridos presentes en diferentes glicoesfingolípidos presentes en las células epiteliales del aparato respiratorio (Abul-Milh et al., 1999; Ramjeet et al., 2005). No obstante, a pesar de la implicación del LPS en la adhesión, su papel no es esencial,

debido a la presencia en la bacteria de otros factores de adhesión (Boekema et al., 2003).

Así pues, en el proceso de adhesión de *A. pleuropneumoniae* a las células epiteliales del aparato respiratorio del cerdo también pueden estar involucradas fimbrias de tipo IV, que se desarrollan una vez que la bacteria entra en contacto con ellas (Boekema et al., 2004b; Zhou et al., 2013). También se ha observado en diversos estudios, la presencia de diferentes exoproteínas, como algunas proteínas de la membrana externa (Omp), entre ellas la OmpA, que podrían jugar un papel relevante en la adhesión a las células epiteliales alveolares (Chung et al., 2007; Overbeke et al., 2002; Stancheva et al., 2022). Así como también se ha descrito la presencia de una adhesina trimérica autotransportadora, que parece jugar un importante papel tanto para la capacidad de adhesión de la bacteria a los tejidos del hospedador, como para su capacidad para formar autoagregados y biofilm (Wang et al., 2015b; Xiao et al., 2012; J. Zhu et al., 2023).

Este biofilm producido por *A. pleuropneumoniae* también se ha sugerido por varios estudios que podría actuar como una adhesina (Izano et al., 2007; Kaplan & Mulks, 2005; Labrie et al., 2010), contribuyendo a la colonización por la bacteria durante la fase aguda de la infección y a la persistencia de esta en los tejidos dañados (L. Li et al., 2014).

Dentro del proceso de colonización, una vez la bacteria se ha adherido a las células del hospedador, el establecimiento de la infección depende de la capacidad de *A. pleuropneumoniae* para adquirir los nutrientes esenciales que necesita para su crecimiento, en especial hierro (Fe), considerándose entre los más importantes factores de patogenicidad, los mecanismos de la bacteria para superar la restricción de Fe (Bossé et al., 2002).

Para este fin, en condiciones de limitación de hierro, la bacteria expresa varias exoproteínas especializadas en su captación (Diarra et al., 1996; Stancheva et al., 2022). Entre estos mecanismos de captación de hierro destacan las proteínas de unión a la transferrina Tbp 1 y Tbp 2, cuya función es obtener Fe a partir de la transferrina porcina (Baltes et al., 2002; Gonzalez et al., 1990).

También se ha observado que *A. pleuropneumoniae* es capaz de adquirir Fe a través de diversos sideróforos, como hidroxamato y catecol; estos sideróforos son compuestos que actúan quelando el hierro férrico de forma exógena, para

posteriormente permitir su asimilación a través de exoproteínas que actúan como receptores de membrana (Diarra et al., 1996). Entre estos receptores de membrana, esta bacteria también posee los denominados FhuA y HgbA, específicos de ferricromo y hemoglobina respectivamente, que actúan captando estas moléculas para utilizarlas como fuente de Fe (Shakarji et al., 2006).

El lípido A del LPS de *A. pleuropneumoniae* también es capaz de captar la hemoglobina del cerdo, convirtiéndose la hemoglobina que se libera de los eritrocitos lisados por la acción de sus hemolisinas en una fuente de hierro para la bacteria (Belanger et al., 1995).

De igual modo que con el hierro, también existen otros nutrientes limitantes para la colonización y crecimiento de la bacteria en el hospedador, como el níquel, que igualmente se encuentra en bajas cantidades en el cerdo, y para el que se ha sugerido que *A. pleuropneumoniae* también posee mecanismos de captación (Bossé et al., 2001).

2.1.3.2. Evasión de los mecanismos de defensa del hospedador

La defensa efectiva contra las infecciones bacterianas en el pulmón depende de una rápida eliminación de las bacterias del tracto respiratorio (Bossé et al., 2002).

Uno de los primeros mecanismos de defensa del hospedador consiste en incrementar la temperatura, induciendo un estado febril para comprometer la evolución de la infección, llegando a observarse en el caso de las infecciones por *A. pleuropneumoniae* temperaturas de hasta los 41°C (Sassu et al., 2017a), en este sentido se ha sugerido la presencia de diversos mecanismos de supervivencia de esta bacteria en situaciones de estrés por calor, como los mediados por el sistema CpxA/CpxR y por la proteasa HtrA (Heat temperature requirement A), que se encargan de mantener la homeostasis proteica, evitando que una hipotética desnaturalización de proteínas producida como efecto de la fiebre pudiese llevar a la muerte de la bacteria (Liu et al., 2022; Zhang et al., 2022b).

El mecanismo de limpieza mucociliar es muy importante a la hora de proteger el pulmón de infecciones, pero si la tasa de multiplicación de la bacteria excede a la tasa de eliminación, la población de bacterias irá creciendo gradualmente, acumulándose y finalmente causando enfermedad (Bossé et al., 2002). Se ha sugerido que *A. pleuropneumoniae* posee factores de virulencia como la producción

de peróxido de hidrógeno y actividad ureasa, que pueden interferir en el correcto funcionamiento del sistema mucociliar (Bossé & MacInnes, 2000; Langford et al., 1996). Las bacterias no eliminadas por este sistema mucociliar pueden ser eliminadas por la acción de células fagocíticas, siendo los macrófagos (alveolares, intersticiales e intravasculares) los fagocitos predominantes en el tracto respiratorio inferior, mientras que el número de neutrófilos es pequeño, aumentando este rápidamente tras una infección (Bossé et al., 2002).

Se ha especulado que la formación de biofilm por parte de *A. pleuropneumoniae* podría incrementar su resistencia a la fagocitosis, pareciendo jugar el *pilus* Flp un importante papel en este cometido (T. Li et al., 2019).

Por otro lado, la cápsula de *A. pleuropneumoniae* es capaz de inhibir la actividad bactericida del suero y tiene capacidades antifagocíticas, de tal modo que a pesar de que los anticuerpos frente a la cápsula tienen efecto opsonizante, éstos no son completamente protectores (Inzana et al., 1988). Este efecto parece deberse a que la cápsula de *A. pleuropneumoniae*, a pesar de que no previene la activación del complemento o la unión de C3 a la superficie de la bacteria, sí que limita la cantidad de anticuerpos y C9 (componente de complejo de ataque a membrana) que se unen a *A. pleuropneumoniae* (Ward & Inzana, 1994). Además, los anticuerpos neutralizantes frente a los CPS y LPS de *A. pleuropneumoniae* también contribuyen a esta resistencia de *A. pleuropneumoniae*, mediante la disminución de la cantidad de C9 que se une a la bacteria, y posiblemente dirigiendo la deposición de C9 y por tanto el complejo de ataque a membrana, a lugares de la superficie de la bacteria que no serían letales para la misma (Udeze & Kadis, 1992; Ward & Inzana, 1994). Estos dos mecanismos de resistencia podrían actuar en diferentes etapas de la infección para limitar la capacidad del complemento de eliminar la bacteria (Ward & Inzana, 1994).

También se ha observado como los neutrófilos, en respuesta a la infección por *A. pleuropneumoniae*, liberan trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Bonilla et al., 2022; de Buhr et al., 2019), las cuales no sólo son evadidas por la bacteria, sino que además es capaz de aprovecharlas en su propio beneficio, mediante el uso de nucleasas del hospedador o de otras bacterias, como fuente de NAD y adenosina para su propia multiplicación (de Buhr et al., 2019).

Por otro lado, las toxinas Apx producidas por *A. pleuropneumoniae* estimulan el metabolismo oxidativo de los neutrófilos a concentraciones relativamente bajas, y son capaces de destruir a neutrófilos y macrófagos a altas concentraciones (Dom et al., 1992b; Udeze & Kadis, 1992).

Del mismo modo, precediendo a la inactivación de los macrófagos, *A. pleuropneumoniae* también estimula la producción de radicales de oxígeno por parte de los mismos, que son tóxicos tanto para la bacteria como para las células, así como estimula la liberación de factores quimiotácticos que promueven el influjo de neutrófilos hacia el pulmón (Dom et al., 1992a).

Aun así, tanto neutrófilos como macrófagos alveolares son capaces de fagocitar la bacteria (Crujisen et al., 1992). Los neutrófilos son capaces de destruirla en un 95%, ya que presentan una mayor producción de superóxido y peróxido de hidrógeno, sin embargo, los macrófagos no se muestran capaces de hacerlo, probablemente debido a que la liberación de toxinas dentro del macrófago disminuye la capacidad del mismo para destruir la bacteria, así como por la posibilidad de que la bacteria produzca daños en el metabolismo del oxígeno del macrófago o por la liberación de una proteasa que induce que la bacteria escape del fagosoma (Crujisen et al., 1992; Cullen & Rycroft, 1994; Tascón et al., 1994; Wang et al., 2015a), cometidos para los que parece que la proteína Adh, que forma parte de la Adhesina Trimérica Autotransportadora (TAA) juega un papel relevante, así como las diversas proteínas incluidas en las vesículas de la membrana externa (OMV) liberadas por la bacteria, sugiriéndose que ambos procesos también podrían estar relacionados con una inhibición en la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de estos macrófagos alveolares (J. Zhu et al., 2023; Z. Zhu et al., 2022).

La presencia de una proteína de membrana tipo TolC1, de la proteasa HtrA y del regulador OxyR también parece que juegan un importante papel en esta fase de la patogenia de *A. pleuropneumoniae*, protegiendo a la bacteria frente al estrés oxidativo que se genera en esta fase de la infección (Guo et al., 2023; Y. Li et al., 2019; Zhang et al., 2022b), considerándose la proteína TolC1 relacionada con procesos de detoxificación y con el mantenimiento de la integridad de la bacteria en condiciones hostiles, además de estar involucrada en la secreción de toxinas Apx (Y. Li et al., 2019). También ha sido localizada en la membrana de la bacteria una proteína tipo TolC2, estando vinculada con la resistencia a la lisis por el

complemento, así como a la fagocitosis por parte de los macrófagos (Y. Li et al., 2017).

Las lesiones en las membranas celulares inducidas por las toxinas Apx pueden ser inducidas extracelularmente, previamente a la fagocitosis, impidiendo la misma alterando la funcionalidad de la célula fagocítica, o bien intracelularmente, tras la internalización, llevando a la disrupción del fagosoma y de la membrana celular, con la consiguiente liberación de la bacteria al medio extracelular (Tascón et al., 1994). En este sentido, diversos estudios han sugerido que tanto la toxina Apx I, como la toxina Apx II, a bajas concentraciones inducen la apoptosis de macrófagos alveolares mediante diferentes vías, y en altas concentraciones inducen su muerte mediante necrosis, dañando en todos los casos los mecanismos de defensa del hospedador (Chien et al., 2009; Hu et al., 2023; Tang et al., 2023; C. M. Wu et al., 2011).

A. pleuropneumoniae también posee una enzima Cu-Zn superóxido dismutasa, que podría tener la capacidad de dismutación del superóxido derivado de las células fagocíticas (Langford et al., 1996), así como también posee actividad ureasa, pudiendo los productos de degradación de la urea dañar a los fagocitos del hospedador (Bossé & MacInnes, 2000).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se ha sugerido que las bacterias que escapan de la acción del aparato mucociliar y penetran en el espacio alveolar, son fagocitadas por macrófagos alveolares, estos macrófagos alveolares cargados de *A. pleuropneumoniae* pueden penetrar en el tejido pulmonar migrando a través del epitelio alveolar o a través de los agregados linfo-foliculares del pulmón, pero en lugar de ser lisado por los macrófagos, *A. pleuropneumoniae* es capaz de destruir a los macrófagos, con lo que se amplifica la respuesta inflamatoria por la cual se produce un influjo de neutrófilos, que finalmente son quienes destruyen la bacteria, previniendo una sepsis bacteriana (Crujisen et al., 1992). Así pues, la diferencia entre los casos severos y moderados de pleuroneumonía porcina podrían deberse a la cantidad de bacteria que es capaz de alcanzar los pulmones, bien por variaciones entre animales en la cantidad de anticuerpos neutralizantes frente a las toxinas o por variaciones en la cantidad de anticuerpos opsonizantes de la bacteria, ya que estos últimos podrían facilitar el transporte de la bacteria hacia los tejidos pulmonares, por tanto, animales con ausencia de anticuerpos neutralizantes frente a las toxinas junto con presencia de opsoninas podrían ser los más susceptibles de

padecer los casos más severos de pleuroneumonía porcina (Cruijisen et al., 1992). En este mismo sentido, se ha sugerido la posible existencia de un mecanismo de citotoxicidad alternativo, conocido como citotoxicidad mediada por células anticuerpo dependiente (ADCC), que puede estar relacionado con el desarrollo de las lesiones, ya que se ha observado que el incremento del nivel de inmunoglobulinas frente a determinados antígenos de la bacteria provoca un incremento en el grado de lesiones pulmonares (Antenucci et al., 2018).

A. pleuropneumoniae también es capaz de secretar proteasas, con capacidad de degradar gelatina, hemoglobina e inmunoglobulina A, la cual juega un importante papel de defensa en las secreciones nasales y traqueales del cerdo, por lo que la secreción de estas proteasas podría generar una interferencia con la respuesta inmune del hospedador, si bien no ha sido demostrado *in vivo* que esta proteasa tenga la capacidad de degradar la inmunoglobulina G, que juega un papel más relevante en la protección a nivel del parénquima pulmonar (Negrete-Abascal et al., 1994, 1998).

2.1.3.3. Daño a los tejidos del hospedador

Si bien ha sido descrito que el LPS de *A. pleuropneumoniae* puede jugar cierto papel en la patogenia de la enfermedad (Fenwick et al., 1986; Ramjeet et al., 2005; Udeze et al., 1987), la mayor parte de las consecuencias patológicas de la pleuroneumonía porcina se atribuyen a las toxinas Apx, las cuales ejercen efectos citotóxicos sobre varios tipos celulares, tanto directa como indirectamente, estimulando la liberación de citoquinas proinflamatorias a través de los fagocitos activados (Bertram, 1988; Bossé et al., 2002; Chang et al., 2014; Tascón et al., 1994).

Diversos estudios han mostrado como varios de los componentes de *A. pleuropneumoniae*, relacionados con la colonización y producción de toxinas, estimulan la producción de las citoquinas proinflamatorias Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), Intereleuquina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8 y resistina, generando una marcada infiltración de neutrófilos, seguido de un incremento del número de macrófagos en los pulmones, llevando a una infiltración excesiva de macrófagos y neutrófilos en el pulmón (Baarsch et al., 1995; H. Huang et al., 1999; B. Li et al., 2018). Esta producción de citoquinas está localizada en el pulmón y no diseminada sistémicamente, estando estas citoquinas proinflamatorias involucradas en el desarrollo de las lesiones de la pleuroneumonía aguda (Baarsch et al., 1995).

La estimulación del metabolismo oxidativo por parte de macrófagos y neutrófilos desencadenada por *A. pleuropneumoniae* lleva a una producción y liberación excesiva de radicales oxígeno al medio, así como a la liberación de potentes enzimas lisosomales que se producen por estos fagocitos cuando son destruidos por las toxinas Apx, produciendo daño celular y destrucción de los tejidos circundantes, estando por tanto estos fenómenos involucrados en las lesiones pulmonares producidas por *A. pleuropneumoniae* (Dom et al., 1992a,b).

Una vez se ha producido la destrucción de los tejidos circundantes, *A. pleuropneumoniae* tiene la capacidad de persistir y crecer dentro de las lesiones necróticas en un ambiente de anaerobiosis, lo cual es fundamental para su supervivencia (I. Jacobsen et al., 2005). Se ha sugerido que la presencia de una dimetil sulfóxido (DMSO) reductasa en *A. pleuropneumoniae* podría ser una de las claves para la supervivencia de la bacteria en dichas condiciones de anaerobiosis (Baltes et al., 2003).

Además de los daños producidos sobre neutrófilos y macrófagos, las toxinas Apx también son citotóxicas para las células endoteliales del pulmón, generando fenómenos de vasculitis y trombosis (Serebrin et al., 1991), así como para las células epiteliales alveolares tipo II, lo que junto con el daño producido en células fagocíticas y células endoteliales referidos anteriormente, son los principales responsables de las lesiones pulmonares que se producen en la pleuroneumonía porcina (Van Kerkhof et al., 1996).

Por otro lado, también se ha detectado la existencia de cepas de *A. pleuropneumoniae* que tienen la capacidad de diseminarse por el organismo del cerdo durante la fase aguda de la infección, sin estar aún clarificado si está diseminación sistémica se produce a raíz de las lesiones en el endotelio vascular del pulmón o bien vía sistema linfático (Hoeltig et al., 2018). Esta diseminación sistémica no causa necesariamente lesión o respuesta inmune en los diversos órganos, si bien se han observado histológicamente algunos casos leves de nefritis, hepatitis, artritis, así como posibles inicios de meningitis (Hoeltig et al., 2018).

2.1.4. Inmunología

2.1.4.1. Respuesta inmune innata

Si bien *Actinobacillus pleuropneumoniae* parece que tiene la capacidad de retrasar la respuesta inmune por parte de los animales infectados durante los estadios más iniciales de la infección, más tarde se desencadena una respuesta inmune innata en la que la acción del complemento y la cascada de la coagulación juegan un importante papel (Zhu et al., 2020).

Tras la infección experimental por *Actinobacillus pleuropneumoniae* se ha descrito por varios estudios la activación del sistema inmune del cerdo a través de receptores tipo Toll (TLR), tipo NOD (NLR), y receptores tipo RIG-I (RLR) estando todos ellos implicados en el desencadenamiento de los mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa (Yu et al., 2013; Zuo et al., 2013).

En este sentido, se ha observado como los receptores TLR4 son una parte importante de la defensa de un hospedador ante la infección por bacterias Gram negativas, debido a que este receptor reconoce los LPS bacterianos con la ayuda del co-receptor CD14 y las proteínas auxiliares LBP y MD2 (Janeway & Medzhitov, 2002; R. Zhu et al., 2020).

Así pues, tras la infección por *A. pleuropneumoniae*, los LPS de su superficie son reconocidos por los receptores TLR4 de las células presentadoras de antígenos, principalmente macrófagos, que forman parte de la respuesta inmune innata del hospedador (Brogaard et al., 2015; B. Li et al., 2018).

Tal y como muestran diferentes estudios, este proceso tiene como resultado una respuesta proinflamatoria mediada por citoquinas, elevándose los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , resistina e IL-17 en los tejidos pulmonares, lo que va a generar el reclutamiento y por tanto un incremento de neutrófilos y macrófagos en el pulmón, así como también se desencadena la producción de proteínas de fase aguda (PFA) (Baarsch et al., 2000; Brogaard et al., 2015; Hedegaard et al., 2007; Jarosova et al., 2022; B. Li et al., 2018; Sassu et al., 2017a,b).

De igual modo, también se ha descrito como las toxinas Apx desencadenan la producción de IL-1 β , IL-8 y TNF- α por parte de los macrófagos alveolares (Hsu et al., 2016).

Hay cierta controversia entre los resultados de diversos estudios en cuanto a los perfiles de citoquinas producidos durante la infección, probablemente debido al diseño de los estudios (*in vivo* vs *in vitro*), componentes utilizados para la inoculación, así como al tipo de muestra utilizado (suero o tejidos) (Czyzewska-Dors et al., 2017). Así, algunos autores han referido la no detección de TNF- α , sugiriendo que esta citoquina no se expresa activamente durante la pleuroneumonía porcina, así como otros autores han detectado la expresión de Interferón- γ (γ -IFN), si bien el rol de esta última en la inmunopatogenia de la enfermedad no ha sido claramente definido (Czyzewska-Dors et al., 2017).

Diversos estudios han mostrado como la secreción de citoquinas proinflamatorias tiene como consecuencia la síntesis e incremento de los niveles séricos de las proteínas de fase aguda Amiloide Sérico A (SAA), Proteína C Reactiva (CRP), Haptoglobina (Hp) y proteína de fase aguda principal del cerdo (pigMAP) (Gómez-Laguna et al., 2014; Heegaard et al., 1998; Sassu et al., 2017a).

El SAA es un factor quimiotáctico para diferentes células del sistema inmune como monocitos, neutrófilos y linfocitos T; la CRP participa en la activación del complemento y en la opsonización, e induce la producción de citoquinas por parte de los macrófagos; y la Hp interactúa con la hemoglobina formando complejos que disminuyen la disponibilidad de hierro para la bacteria (Gómez-Laguna et al., 2014).

Además de producirse una reducción en las concentraciones de hierro, también se desencadena una reducción en las concentraciones séricas de zinc, hechos que en conjunto parece que tienen el objetivo de reducir las posibilidades de crecimiento de la bacteria (Baarsch et al., 1995; Gómez-Laguna et al., 2014)

En resumen, en primer lugar, se desencadena una respuesta inmune innata e inespecífica frente a bacterias mediada por neutrófilos, monocitos y macrófagos (Liggett et al., 1987; Ondrackova et al., 2013), observándose también un importante incremento de linfocitos $\gamma\delta$, que participan en la conexión de los mecanismos de la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa (Faldyna et al., 2005).

2.1.4.2. Respuesta inmune adaptativa

El reconocimiento de patógenos microbianos por parte de los receptores TLR4 de las células presentadoras de antígenos, da lugar a respuestas inmunes de tipo adaptativo a los antígenos derivados de dichos patógenos, siendo estos receptores

junto con el receptor asociado CD14 y la expresión de la proteína MD2 el puente de unión de la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa (Janeway & Medzhitov, 2002; R. Zhu et al., 2020), siendo estas respuestas principalmente de tipo Th1, es decir de tipo humoral (Janeway & Medzhitov, 2002). En consecuencia, tras la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* se detecta también un incremento en las poblaciones de linfocitos B en los linfonodos traqueobronquiales (Faldyna et al., 2005).

Esta respuesta de tipo humoral está mediada por anticuerpos dirigidos fundamentalmente frente a polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos y proteínas de la membrana externa (Omp) de *A. pleuropneumoniae*, así como frente a las toxinas Apx (Bossé et al., 1991), estando especialmente relacionados con la protección de los animales frente a la enfermedad los anticuerpos neutralizantes dirigidos a las toxinas Apx (Crujisen et al., 1995c; Devenish et al., 1990; Furesz et al., 1997), y contribuyendo parcialmente a la protección el resto de los anticuerpos Crujisen et al., 1995c; Haesebrouck et al., 1996).

Se ha sugerido que la protección que confieren estos anticuerpos es completa cuando la reinfección es de tipo homólogo, mientras que, en el caso de reinfecciones por serotipos heterólogos, el grado de protección puede ser variable (Crujisen et al., 1995b).

Esta respuesta serológica incluye anticuerpos de isotipo IgM, IgG e IgA; que se pueden detectar a nivel sanguíneo, nasal y bronco-alveolar; aunque si bien a nivel nasal el isotipo predominante es IgA, a nivel bronco-alveolar se pueden detectar por igual IgA e IgG (Bossé et al., 1991; Krejci et al., 2005). En cuanto al isotipo IgM, su detección a nivel nasal y bronco-alveolar es residual, reflejándose su incremento principalmente a nivel sanguíneo (Bossé et al., 1991; Krejci et al., 2005). Las IgA detectadas a nivel nasal es producida a nivel local, mientras que las IgG detectadas a este mismo nivel son de origen sistémico (Bossé et al., 1991).

Así pues, en primer lugar, se desencadena una subida en los niveles de isotipo IgM con una posterior declinación, así como una respuesta sostenida de IgG, esta última podría resultar de una estimulación inmune prologada debida a una infección persistente (Bossé et al., 1991).

Tal y como se ha observado en diferentes estudios, el desarrollo de anticuerpos propios mediante una infección previa con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, así

como la protección pasiva conferida mediante la transferencia de anticuerpos de origen maternal de la cerda a sus lechones o una transferencia de IgG de animales convalecientes, confieren protección frente a la enfermedad, lo cual se ha postulado como una destacada evidencia de la importancia de los anticuerpos específicos en la resistencia frente a la pleuroneumonía porcina (Bossé et al., 1991; Crujisen et al., 1995c; Furesz et al., 1997; Nechvatalova et al., 2005; Sjölund et al., 2011a), en especial las IgG e IgA presentes en el tracto respiratorio, obteniéndose los mejores resultados en términos de protección cuando los lechones en presencia de inmunidad maternal son expuestos a dosis bajas de la bacteria, siendo esta situación la más común en condiciones naturales (Krejci et al., 2005; Nechvatalova et al., 2005).

En los estadios más avanzados de la infección, se ha sugerido que la bacteria podría cambiar su tropismo por el tracto respiratorio inferior al tracto respiratorio superior, en un intento de escapar de la respuesta inmune a nivel pulmonar (Sassu et al., 2017b). Así, una vez que *A. pleuropneumoniae* coloniza el tejido tonsilar, la bacteria desencadena la producción de IL-10, citoquina de marcado carácter antiinflamatorio, con el objetivo de producir una infección persistente sin poder ser eliminada de las tonsilas (Müllebner et al., 2018).

De hecho, se ha llegado a observar una correlación negativa entre la citoquina proinflamatoria IL-17A en pulmón, que se produce en la fase aguda de la infección con el objetivo de eliminar la bacteria del tejido pulmonar y la citoquina antiinflamatoria IL-10 que se produce una vez que la bacteria está en la tonsila, para permitir la persistencia de la bacteria en esta localización sin ser eliminada, estando la producción de ambas citoquinas altamente asociada, posiblemente a poblaciones de linfocitos Th17 APP-específicos (Müllebner et al., 2018; Sassu et al., 2017b).

2.1.5. Cuadro clínico

La presentación de la pleuroneumonía porcina ha sido descrita bajo 3 formas clínicas diferentes: hiperaguda, aguda, y subaguda o crónica, pudiendo encontrarse todas las formas dentro de un mismo grupo de animales afectados (Gottschalk & Broes, 2019):

- La forma hiperaguda, que se caracteriza por una alta mortalidad y muertes súbitas, tiene un curso rápido, con animales que sufren fiebre (41°C), apatía,

anorexia, vómito, piel cianótica y permanecen inmóviles sin sintomatología respiratoria evidente, frecuencia cardíaca aumentada y fallo cardiovascular; en la fase terminal se puede observar una disnea severa y la temperatura rectal disminuye, observándose finalmente una descarga de espuma sanguinolenta a través de boca y nariz (Gottschalk & Broes, 2019; Sassu et al., 2018).

- En la forma aguda se observa fiebre (40,5-41°C), piel enrojecida, animales deprimidos, reducción en el consumo de agua y alimento, sintomatología respiratoria severa con disnea, tos y respiración por boca, y si no se inicia una terapia adecuada, en función de la extensión de las lesiones, los animales afectados pueden finalmente llegar a morir (Gottschalk & Broes, 2019; Sassu et al., 2018). En los brotes que cursan con la forma aguda, la morbilidad puede variar del 10 al 100% y la mortalidad del 1 al 10% (Sassu et al., 2018).
- La forma crónica o subaguda se desarrolla tras la forma aguda, o cuando el tratamiento o medidas preventivas no son completamente eficaces, así como por la infección de serotipos con un grado de virulencia intermedio. Puede cursar sin fiebre, tos intermitente de diferente intensidad, y el apetito de los animales afectados se puede ver reducido; con una mortalidad más baja que en las formas anteriores. (Gottschalk & Broes, 2019; Sassu et al., 2018).

Esta enfermedad también afecta al rendimiento y productividad de los cerdos en fase de engorde (Sassu et al., 2018), de hecho, la presencia de *A. pleuropneumoniae* en animales en fase post destete está asociada a un incremento en el índice de conversión de pienso y una reducción en la ganancia media diaria en los animales durante el periodo de engorde (Baraldi et al., 2019; Straw et al., 1989).

Se han descrito diversos factores que pueden afectar al curso de la enfermedad, como son la edad y raza de los animales afectados, condiciones medioambientales en las que están alojados, estatus inmunitario, grado de exposición a la bacteria, así como la virulencia de una cepa o serotipo determinado (Gottschalk & Broes, 2019; Sassu et al., 2018).

Los brotes de la enfermedad, si bien pueden afectar a animales de cualquier edad, de media afectan a animales de unas doce semanas de vida, pudiendo llegar a afectar al 50% de los animales en 4 días (Klinkenberg et al., 2014). Se ha sugerido que el tamaño de los brotes podría estar relacionado con el número de animales susceptibles (colonizados y no colonizados), y posiblemente animales que van perdiendo la

inmunidad maternal a lo largo del transcurso del brote, lo que explica por qué los brotes más grandes y duraderos se dan en animales jóvenes (Klinkenberg et al., 2014).

En cuanto a la influencia de la raza, se ha observado un diferente grado de severidad en los signos clínicos de la enfermedad en función de la misma, observándose una baja susceptibilidad en cerdos de raza Hampshire, así como una alta susceptibilidad en las razas Large White y Landrace alemán, por lo que se ha sugerido la existencia de diferencias de origen genético en la susceptibilidad de los cerdos a la infección por *A. pleuropneumoniae* (Hoeltig et al., 2009). En este sentido, tras la caracterización del gen de la transferrina en diferentes razas de cerdos, se han encontrado evidencias de una asociación entre la severidad de la enfermedad y los genotipos de este gen presentes en la raza Landrace alemán (Daniłowicz et al., 2010). Posteriormente, tras una infección estandarizada, se demostró la existencia de loci de rasgo cuantitativo (QTL) que están vinculados al desarrollo de la pleuroneumonía porcina (Reiner et al., 2014), así como mediante secuenciación genómica se han identificado polimorfismos de nucleótido único (SNPs) asociados a diferentes regiones del genoma, localizadas en genes involucrados en la patogenia de la pleuroneumonía, pertenecientes a tres cromosomas (SSC2, SSC12 Y SSC15), que han confirmado la base genética para la resistencia a pleuroneumonía porcina (Nietfeld et al., 2020).

Las coinfecciones son más frecuentes en las granjas que las infecciones simples, utilizándose frecuentemente el término complejo respiratorio porcino (CRP) para describir coinfecciones que engloban virus como el virus de síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), el virus de la influenza porcina (swIAV) y el circovirus porcino tipo 2 (PCV2), junto con bacterias como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Bordetella bronchiseptica* (Saade et al., 2020).

Se ha observado como cerdos infectados experimentalmente con *Mycoplasma hyopneumoniae*, y posteriormente con *Actinobacillus pleuropneumoniae* han padecido unos signos clínicos más severos (hipertermia, tos y muerte), lesiones pulmonares más graves y una ganancia media diaria (GMD) más reducida que animales infectados con ambos patógenos simultáneamente o individualmente con cada uno de ellos (Marois et al., 2009), sugiriéndose como posible motivo de esta interacción, el hecho de que los macrófagos de cerdos infectados por *Mycoplasma hyopneumoniae* podrían reducir su capacidad fagocítica frente a *A. pleuropneumoniae* (Saade et al., 2020).

En cerdos también infectados experimentalmente con *A. pleuropneumoniae* y swIAV se ha podido determinar como el primero puede potenciar la neumonía y los signos clínicos inducidos por el segundo, sugiriendo que *A. pleuropneumoniae* puede facilitar o potenciar la replicación del virus de la influenza porcina en los tejidos del aparato respiratorio (Pomorska-Mól et al., 2017). Por otro lado, también se ha sugerido que la infección previa por swIAV en una primera fase puede generar la liberación de NETs por parte de los neutrófilos, que puede ser aprovechada por bacterias como *A. pleuropneumoniae* para su crecimiento, y en una fase posterior la infección por swIAV podría generar una reducción de la actividad oxidativa de los neutrófilos, provocando una reducción de su actividad bactericida y facilitando con ello la infección por *A. pleuropneumoniae* (Lassnig et al., 2024). En este sentido, también se ha observado como la coinfección por estos dos patógenos genera un efecto sinérgico en lo que respecta a la producción de citoquinas proinflamatorias, con unas mayores concentraciones de IL-1 β , IL-8 e IFN- α que la infección de ambos agentes por separado, lo que puede parcialmente explicar los signos clínicos y lesiones más severas producidos durante esta coinfección (Czyzewska-Dors et al., 2017).

Los síntomas clínicos de la pleuroneumonía porcina también se ha observado que pueden ser exacerbados por la infección concomitante con el virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV), sugiriéndose por diversos estudios que la infección por ADV causa en los animales un estado de inmunodepresión que podría estar detrás del citado efecto (Sakano et al., 1993).

Sin embargo, no se ha observado un efecto sinérgico en la coinfección por el virus PRRS y *A. pleuropneumoniae*, así, en una infección experimental previa con el virus PRRS no se observó una potenciación de las lesiones pulmonares inducidas por APP (Pol et al., 1997). Por el contrario, sí que se ha visto a nivel experimental, que la infección previa de macrófagos alveolares y células epiteliales del tracto respiratorio del cerdo con *A. pleuropneumoniae* bloqueó la infección por el virus PRRS, observándose un cierto efecto antiviral en los metabolitos secretados por APP, sugiriendo que pueden inducir una mayor secreción de IFN- γ (Lévesque et al., 2014). Estudios posteriores han demostrado que la infección por *A. pleuropneumoniae* modifica el ciclo celular de las células epiteliales del tracto respiratorio reduciendo su proliferación, de tal modo que las hace más resistentes a la infección por PRRS, así como también puede afectar a la entrada por endocitosis del virus a los macrófagos alveolares; siendo este efecto antiviral posiblemente producido por dos moléculas que fueron identificadas en el sobrenadante

de los cultivos de *A. pleuropneumoniae*, y teniendo lugar este efecto durante las fases iniciales de la infección por el virus (Ferreira Barbosa et al., 2015; Reyes et al., 2018).

Respecto a la coinfección con PCV2, se ha sugerido que este virus facilita la adhesión, la invasión y la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en macrófagos alveolares tanto *in vivo* como *in vitro*, de manera que APP causa una mayor citotoxicidad sobre las células (Qi et al., 2019).

También se ha sugerido que la interacción entre *Streptococcus suis* y *A. pleuropneumoniae* podría ser sinérgica bajo determinadas condiciones, ya que en estudios experimentales se ha observado que el co-cultivo de ambas bacterias puede resultar en un incremento en la resistencia a los antibióticos y una mayor expresión de genes de virulencia en el biofilm producido por ambas bacterias, sugiriéndose que los biofilm mixtos podrían reforzar la patogenicidad tanto de una como de otra bacteria (Wang et al., 2020b).

2.1.6. Lesiones

En cuanto a las lesiones producidas por *A. pleuropneumoniae*, vistas en un modo secuencial, durante las primeras horas de la enfermedad se puede observar un edema pulmonar con hemorragias petequiales multifocales, así como bronquiolitis y alveolitis neutrofílica difusa. Mas tarde se pueden observar áreas focales de necrosis coagulativa desarrolladas en áreas de intensa supuración. Y a las 24-48 horas de la infección ya se pueden observar áreas necróticas rodeadas por una densa banda de leucocitos degenerados (Liggett et al., 1987).

A nivel pleural se produce una pleuritis fibrinosa, pudiéndose observar la superficie del pulmón cubierta de fibrina, que junto con la hemorragia que se produce a nivel pulmonar ocasiona el acúmulo en la cavidad torácica de un líquido sanguinolento pudiendo contener coágulos de fibrina (To et al., 2023).

A medida que transcurre el tiempo, las áreas necróticas pulmonares tienden a resolverse si el animal supera el proceso, mediante la formación de tejido fibrótico y cicatrización (Liggett et al., 1987; Maes et al., 2023). Es por ello por lo que, en las formas subaguda o crónica de la enfermedad, se puede observar la formación de una gruesa capa de tejido de granulación alrededor del margen externo de los abscesos

desarrollados, formando áreas conocidas como secuestros (Liggett et al., 1987; Merialdi et al., 2012).

Por otro lado, la fibrina que se ha ido depositando en las superficies serosas, gradualmente se va organizando y puede llevar al desarrollo de adhesiones entre pleura parietal y pulmonar, incluso pericardio, llegando a ser tan firmes que con frecuencia resultan en el desgarro de los pulmones durante la necropsia o en el faenado de la canal en matadero, dejando partes del pulmón adheridas a la pared torácica (Maes et al., 2023).

Así pues, esta enfermedad puede dar lugar a unas alteraciones pulmonares de forma unilateral, bilateral o focal, que pueden variar desde una pleuroneumonía fibrino-hemorrágica a una pleuroneumonía fibrino-necrótica. (Gottschalk & Broes, 2019).

No obstante, si bien *A. pleuropneumoniae* es considerado un patógeno cuyas lesiones se centran en pulmón y pleura, también ha sido descrita la diseminación de determinadas cepas por diversos tejidos del organismo, la mayor parte de las veces probablemente sin causar ningún tipo de lesión, aunque ha podido ser observado en algunos animales la aparición de casos leves de nefritis, hepatitis e incluso inicios de meningitis, así como la aparición de artritis (Hoeltig et al., 2018), incluso se ha reportado un caso de fractura vertebral por osteomielitis causada por *A. pleuropneumoniae* (Giebels et al., 2020).

En cuanto a las lesiones que podemos observar en pulmones de animales a nivel de matadero, procedentes de rebaños infectados, diversos estudios llevados a cabo en varios países como Francia, Bélgica, Italia, Suecia, España y Brasil, demuestran y confirman como la prevalencia (serológica o por PCR) de *A. pleuropneumoniae* en un rebaño está positivamente correlacionada con la frecuencia y severidad de pleuritis en matadero, considerándose con mayor probabilidad como el agente responsable de dichas lesiones (Arruda et al., 2024; Maes et al., 2023; Petri et al., 2023), no obstante, también se ha observado que *Pasterurella multocida*, por si sola o en combinación con *A. pleuropneumoniae*, puede tener influencia en la aparición y/o amplificación de dichas lesiones (Petri et al., 2023; Wallgren et al., 2016). En este mismo sentido, también se ha observado una correlación igualmente positiva entre la cuantificación de ADN de *A. pleuropneumoniae* con el nivel de las consolidaciones pulmonares que se detectan a nivel de matadero (Arruda et al., 2024).

Esta prevalencia de pulmones con pleuritis crónica en matadero puede variar de un 11% a un 27% entre los varios países estudiados por los diferentes estudios (Baraldi et al., 2019; Fablet et al., 2012a,b; Fraile et al., 2010; Merialdi et al., 2012; Petri et al., 2023; Wallgren et al., 2016).

Diversos estudios han sugerido que la frecuencia de estas pleuritis crónicas en matadero, compatibles con APP, se pueden ver asociadas a diversos factores (Fraile et al., 2010; Jäger et al., 2012; Meyns et al., 2011):

- Existencia en granja de un manejo todo dentro-todo fuera por unidad de engorde o nave.
- Numero de cerdos por cuadra durante la fase post-destete, sugiriéndose que puede haber un mayor contacto entre grupos más grandes de animales y por tanto una mayor transmisión de patógenos como *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
- Coexistencia de animales con más de un mes de edad de diferencia en el mismo edificio (compartiendo espacio aéreo).
- Fallos en la limpieza y desinfección, sugiriéndose que una mejor limpieza y desinfección redundaría en una menor cantidad de polvo en el ambiente, así como en una reducción en la carga bacteriana ambiental.
- Un mayor tiempo de vacío sanitario entre lotes, que produce un mejor secado tras la desinfección, y por tanto ayuda a destruir importantes patógenos respiratorios que pueden quedar en las instalaciones.
- Mezclas y movimientos de animales, sugiriéndose que el estrés que causan puede tener un impacto en la inmunidad de los animales, así como son una oportunidad para que *A. pleuropneumoniae* infecte a animales susceptibles.
- Tipo de instalación, ya que se observa una menor frecuencia de pleuritis en instalaciones wean-to-finish, así como una mayor frecuencia en instalaciones de ciclo cerrado.
- Número de orígenes que componen los lotes, detectándose que una mayor frecuencia de compras u orígenes influye positivamente en la aparición de lesiones en matadero.

No obstante, si bien diferentes estudios muestran la influencia de estos factores en la prevalencia de pleuritis en matadero (Fraile et al., 2010; Jäger et al., 2012; Meyns et al., 2011), otros autores no han encontrado asociación entre factores de manejo, condiciones ambientales o signos clínicos con las lesiones en matadero (Hälli et al., 2020).

El impacto de la presencia de pleuritis en matadero sobre los índices zootécnicos de los animales puede ser variable, observándose un descenso en la ganancia media diaria que puede variar de un 5,2% a un 34%, un incremento en la duración del periodo de engorde de 6 a 8 días, así como también se puede observar un incremento en el índice de conversión (Maes et al., 2023). Además de un descenso en los índices productivos, también se producen pérdidas difícilmente cuantificables debido a la heterogeneidad en el crecimiento de los animales de un lote, lo que lleva a un retraso en la salida de algunos animales o bien a asumir un bajo peso de salida a matadero por parte del ganadero, de igual modo el matadero también asume pérdidas asociadas a que las pleuritis en la canal requieren de un procesado adicional, que además reduce la velocidad de la cadena de procesado, incrementando los costes asociados al mismo (Maes et al., 2023).

En cuanto al impacto sobre la calidad de la canal que pueden presentar las pleuritis, se ha observado en un estudio comparativo frente a animales con ausencia de lesiones, un incremento en el pH de la canal al final del faenado, así como un mayor porcentaje de carnes PSE (pálidas, blancas y exudativas) y DFD (secas, firmes y oscuras) (Karabasil et al., 2017).

2.1.7. Diagnóstico

Se debería sospechar de pleuroneumonía porcina ocasionada por *A. pleuropneumoniae* cuando se observan los signos clínicos descritos junto con las lesiones macroscópicas típicas de la enfermedad; si bien el diagnóstico diferencial de la forma hiperaguda en la que se observan pulmones edematosos y color rojo oscuro, debería incluir otras enfermedades como Peste Porcina Clásica, Influenza, Enfermedad de Aujeszky, Salmonelosis Septicémica y Erisipela; así como en los casos agudos en los que se observa pleuroneumonía fibrino-hemorrágica este diagnóstico diferencial debería incluir *Actinobacillus suis* y determinadas cepas de *Pasteurella multocida* (Gottschalk & Broes, 2019).

2.1.7.1. Diagnóstico bacteriológico

El examen bacteriológico del tejido pulmonar lesionado, obtenido durante la necropsia de animales clínicamente afectados, es considerada la muestra más adecuada para el cultivo y aislamiento de la bacteria y por tanto para el diagnóstico de la enfermedad respiratoria ocasionada por *A. pleuropneumoniae* (Gottschalk & Broes, 2019; Sassu et al., 2018).

El cultivo y aislamiento de APP a partir de tonsilas y mucosa nasal de animales infectados se puede realizar mediante el uso de medios selectivos (Chiers et al., 2002b; M. J. Jacobsen & Nielsen, 1995), sin embargo, estos órganos están fuertemente colonizados por otras bacterias, que pueden crecer en los medios de cultivo utilizados para el aislamiento, haciendo por tanto la identificación de APP muy complicada (Gottschalk, 2015).

No obstante, a partir de muestras tonsilares, se ha observado un importante incremento de la tasa de éxito en el aislamiento mediante el empleo de técnicas de aislamiento selectivo por separación inmunomagnética, empleando perlas de poliestireno recubiertas con IgG específica de *A. pleuropneumoniae*, presentando una alta sensibilidad en comparación con los métodos tradicionales mediante el empleo de técnicas de diagnóstico molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Fittipaldi et al., 2003).

El aislamiento de esta bacteria a partir de lesiones de pulmones en matadero es igualmente complicado, por lo que se deben utilizar test de detección directa al igual que para la detección de animales subclínicamente afectados (Gottschalk, 2015).

Una vez aislado *A. pleuropneumoniae*, para la determinación del serotipo en base a sus polisacáridos capsulares se han descrito numerosas técnicas, como aglutinación en tubo, inmunofluorescencia, inmunodifusión, aglutinación en placa, test de aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol, precipitación en anillo, hemaglutinación indirecta, coaglutinación, inmunoelectroforesis, fijación del complemento, cromatografía en papel y precipitación en placa, presentando todas estas técnicas el inconveniente de necesitar de la producción previa de una gran cantidad de antisueros específicos para cada serotipo, ser llevadas a cabo únicamente en laboratorios especializados, y presentar además reacciones cruzadas entre determinados serotipos (Dubreuil et al., 2000). Es por ello, que, con el objetivo de solventar todos estos inconvenientes, se han descrito técnicas de diagnóstico

molecular por PCR para la determinación específica del serotipo, que no presentan las desventajas de las técnicas anteriormente citadas (Bossé et al., 2018a; Gottschalk, 2015).

Para la detección de *A. pleuropneumoniae* a partir de muestras de tejido pulmonar, también han sido descritas técnicas inmunohistoquímicas mediante inmunoperoxidasa, con una sensibilidad superior a las técnicas de cultivo y aislamiento convencional (Gutierrez et al., 1993; Hernández Castro et al., 2002).

2.1.7.2. Diagnóstico molecular

La técnica PCR directa sobre las muestras obtenidas presenta ciertas ventajas, como son una reducción del tiempo para la obtención de resultados y el hecho de que bacterias no viables debido a una mala conservación, aún podrían ser detectadas (Fittipaldi et al., 2003).

Se ha estudiado el uso de hisopados orofaríngeos para la detección por PCR de *A. pleuropneumoniae*, no obstante, la sensibilidad que se ha obtenido a partir de este tipo de muestra ha sido muy baja (Costa et al., 2011). Los fluidos orales para la detección por PCR han sido empleados en otros estudios con resultados más aceptables (Cheong et al., 2017). Por otro lado, el uso de fluidos orales para la detección mediante PCR de las toxinas Apx I, III y IV en granjas de engorde, parece que ha mostrado ser eficaz para una rápida detección de la infección por *A. pleuropneumoniae*, indicando que podría ser de utilidad para evitar la introducción de animales subclínicamente infectados en rebaños negativos (Kleinmans et al., 2022).

Se han desarrollado varias técnicas PCR para la detección y cuantificación de varios genes de *A. pleuropneumoniae* como *aroA*, *dsbE*, *tbpA/tbpB* y un gen que codifica para una metaloproteasa, no obstante, las técnicas basadas en la detección de estos genes bien no han sido capaces de detectar todos los serotipos o bien no son genes específicos de *A. pleuropneumoniae*, con lo que se pueden presentar falsos resultados positivos o negativos (Gottschalk, 2015).

Sin embargo, hay un consenso entre diferentes estudios que han demostrado que el gen de elección para el desarrollo de técnicas PCR capaces de detectar esta bacteria es el gen *apxIVA*, ya que este gen no sólo es específico de *A. pleuropneumoniae*, sino que además es presentado por todos los serotipos,

desarrollándose varias técnicas PCR para realizar a partir de cultivos puros, muestras tonsilares, nasales y pulmonares de animales vivos (S. C. Li et al., 2022; Schaller et al., 2000; Tobias et al., 2012).

También han sido desarrolladas técnicas de amplificación isotérmicas, basadas también en la detección del gen *apxIVA*, que presentan la ventaja de no necesitar el manejo de termocicladores, como la amplificación de la recombinasa polimerasa (RPA) a partir de muestras de tonsila y pulmón (R. Li et al., 2019), o a partir de material biológico procedente de estos órganos impregnado en tarjetas FTA® (Stringer et al., 2021b), así como una técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) a partir de muestras de tonsila (W. Yang et al., 2009), y métodos que combinan RPA con CRISPR/Cas12a a partir de muestras de pulmón (Luan et al., 2022).

Son varios los estudios que han demostrado que para la detección de *A. pleuropneumoniae*, las técnicas basadas en PCR son más sensibles que el aislamiento estándar o por separación inmunomagnética, tanto a partir de muestras de tonsila, como de lavados traqueobronquiales, o de pulmón (Chiers et al., 2002b; Fittipaldi et al., 2003; Savoye et al., 2000), mostrando algunas de las técnicas desarrolladas especificidad estricta para *A. pleuropneumoniae* (pruebas PCR para detección del gen *apxIVA* y gen *omIA*), lo que las convierte también en técnicas complementarias para confirmar los resultados obtenidos mediante serología (Fittipaldi et al., 2003; Savoye et al., 2000).

También a través de PCR para la detección del gen *apxIVA*, se ha podido detectar la bacteria a partir de muestras de aerosoles obtenidos en granjas mediante el uso de un muestreador ciclónico de aire, considerándose una potencial herramienta para la detección de granjas subclínicamente infectadas (Watt et al., 2020).

Por otro lado, la variabilidad genética del gen *omIA*, que codifica para una lipoproteína de la membrana externa, ha sido utilizada para el desarrollo de una técnica PCR que clasifica los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en 5 grupos distintos, así, junto con una PCR para tipificar los genes de las toxinas *Apx*, se podría discriminar entre la mayoría de los serotipos del biovar 1, excepto entre los serotipos 1, 9 y 11 y excepto entre los serotipos 2 y 8 (Gram et al., 2000).

También se ha estudiado el uso de técnicas de análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) para caracterizar y subtipar la bacteria

(Kokotovic & Angen, 2007). De hecho, la caracterización del gen *omIA* de la bacteria ha revelado que los polimorfismos presentes en su secuencia de nucleótidos pueden ser utilizados como marcador para distinguir entre serotipos, evitando problemas de reacciones cruzadas o para caracterizar aislados no tipables (Rossi et al., 2013).

No obstante, el análisis de la secuencia de nucleótidos de los diferentes loci CPS que dan lugar a los polisacáridos de la capsula de la bacteria ha permitido que, mediante técnicas PCR, hoy en día ya sea posible realizar la tipificación de los serotipos de *A. pleuropneumoniae*, desarrollándose dos técnicas multiplex PCR con cebadores específicos para cada uno de estos genes capsulares, con lo que se puede realizar este tipado de una manera fiable, sin reacciones cruzadas (excepto para los serotipos 9 y 11), a partir de muestras procedentes de tejidos, cultivos o incluso tarjetas FTA[®], y con las ventajas que presentan las técnicas de diagnóstico molecular respecto a otros métodos de serotipado (Bossé et al., 2018a; Stringer et al., 2021a,b). Únicamente presentan reacciones cruzadas los mencionados serotipos 9 y 11, debido a que sus genes capsulares únicamente se diferencian en un nucleótido, por lo que, dado que el manejo de ambos serotipos a nivel práctico es el mismo, los cebadores están diseñados de forma que no se detecta diferencia mediante PCR entre ambos serotipos (Y. Li et al., 2023). No obstante, en estudios llevados a cabo mediante la implementación de técnicas PCR *in silico* junto con secuenciación de genoma completo, se ha podido llegar a discriminar entre los serotipos 9 y 11 (Guitart-Matas et al., 2022; S. C. Li et al., 2022), así como mediante análisis de alta resolución de fusión (HRM, de *high resolution melting*) que identifican la variación genética en las secuencias de ácidos nucleicos (Scherrer et al., 2022).

Por último, también ha sido descrito un método para el tipado por PCR del gen del polisacárido O del LPS de *A. pleuropneumoniae* que se ha sugerido que podría ser de utilidad en aquellos casos de aislados no tipables o resultados inexplicables mediante otros métodos debido a los genes compartidos entre los polisacáridos capsulares (CPS) y el polisacárido O de la bacteria (To et al., 2024).

2.1.7.3. Diagnóstico serológico

Se han descrito diversas técnicas para la detección de anticuerpos frente a *A. pleuropneumoniae*, como pruebas de radioinmunodifusión, pruebas de fijación del complemento, test de aglutinación en tubo o placa, ensayos de inmuoadsorción ligado a enzimas, también denominados ensayos inmunoenzimáticos o ELISA (de

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), y test de neutralización de las hemolisinas (Dubreuil et al., 2000).

La seroconversión frente a *A. pleuropneumoniae* tradicionalmente se determinaba a través de la capacidad de los complejos antígeno-anticuerpo de fijar el complemento, medida mediante las pruebas de fijación del complemento (Opriessnig et al., 2013). Esta capacidad de fijar el complemento la tienen los isotipos IgG e IgM, por lo que esta técnica podría ser útil en las etapas tempranas de la infección (Opriessnig et al., 2013). Sin embargo, presenta importantes desventajas como el hecho de que los LPS de otras bacterias Gram negativas pueden activar la cascada del complemento, interfiriendo con el diagnóstico, que se puedan dar reacciones cruzadas con *A. suis*, así como su limitada especificidad y sensibilidad (Opriessnig et al., 2013), lo que ha hecho que esta técnica sea raramente utilizada en la actualidad (Broes et al., 2007; Opriessnig et al., 2013).

Actualmente, las técnicas ELISA son las más utilizadas para diagnóstico serológico, debido a su facilidad de uso, de automatización y a una mayor sensibilidad y especificidad (Teshima et al., 2017), utilizándose a nivel práctico principalmente de dos tipos: basadas en la detección de anticuerpos frente a los CPS o cadena O del LPS (son serotipo o serogrupo específicas) y aquellas basadas en la detección de anticuerpos frente a las toxinas Apx, si bien también se han descrito y desarrollado otras técnicas para la detección de anticuerpos frente a otras proteínas de la bacteria, como proteínas de la membrana externa (Omp) (Tumamao et al., 2004a) o proteínas de unión a la transferrina (Tbp) (Opriessnig et al., 2013).

Por otro lado, también se han desarrollado diferentes técnicas ELISA, desde técnicas *in-house* a kits comerciales, para poder ser utilizadas a partir de diferentes tipos de muestra, como fluidos procedentes de músculo, calostro, fluido nasal, saliva y broncoalveolar, aunque principalmente se utiliza suero, lo que ha hecho su uso más rutinario (Gottschalk, 2015; Loreck et al., 2020).

2.1.7.3.1. Test serológicos específicos de serotipo/serogrupo

Actualmente, basándose en la composición del polisacárido capsular (CPS) se reconocen 19 serotipos diferentes de *A. pleuropneumoniae* (Stringer et al., 2021a), presentando algunos de estos serotipos una estructura similar de la cadena O del lipopolisacárido (LPS) de su superficie (Perry et al., 1990). Por este motivo, se observan reacciones cruzadas entre determinados serotipos cuando

se emplean técnicas serológicas con antígenos basados en el LPS, concretamente estas reacciones cruzadas se pueden producir entre los serotipos 1, 9, 11 y 19; entre los serotipos 4, 7 y 18 y así como entre los serotipos 3, 6, 8, 15 y 17 (Bossé et al., 2018b; Gottschalk, 2015; Stringer et al., 2021a).

Por tanto, el uso de pruebas serológicas basadas en los LPS o CPS de la bacteria nos permite identificar la presencia de anticuerpos frente a los serotipos individuales 2, 5, 10, 13 y 14, así como los serogrupos 1/9/11/19, 4/7/18 y 3/6/8/15/17 (Bossé et al., 2018b; Gottschalk, 2015; Stringer et al., 2021a).

Entre los kits comercialmente disponibles, esta técnica ELISA es la que presenta una mayor sensibilidad a partir de muestras de animales experimentalmente infectados (Opriessnig et al., 2013).

Se ha descrito una técnica de inmunoensayo multiplex con bolas magnéticas para la detección simultánea de anticuerpos frente a los diferentes serotipos a partir de una única muestra de suero, con el objetivo de reducir la cantidad de muestra, trabajo y tiempo necesarios para llevar a cabo el diagnóstico (Berger et al., 2017).

2.1.7.3.2. Test serológicos basados en las toxinas Apx

Si bien se han desarrollado diferentes pruebas ELISA basadas en la detección de anticuerpos contra las toxinas ApxI-III (Giménez-Lirola et al., 2014; Jung et al., 2019; Nielsen et al., 2000; Shin et al., 2011), y aunque los animales convalecientes de la enfermedad desarrollan una potente respuesta humoral frente a estas exotoxinas (Nielsen et al., 2000), tal y como sugieren diversos autores, estas pruebas no deberían ser utilizadas en el diagnóstico de rutina, ya que otras bacterias del cerdo como por ejemplo *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus porcitonillarum*, *Actinobacillus lignieresii* y *Actinobacillus rossii* producen toxinas antigénicamente similares, lo cual puede generar reacciones cruzadas y por tanto falsos resultados positivos (Devenish et al., 1989; Giménez-Lirola et al., 2014; Gottschalk, 2015; Kuhnert et al., 2005; Nielsen et al., 2000; Schaller et al., 2000).

Estas toxinas ApxI-III son estructural y antigénicamente similares (Devenish et al., 1989), por lo que se podrían dar reacciones serológicas cruzadas entre ellas (Giménez-Lirola et al., 2014; Nielsen et al., 2000). Para solventar este problema,

se han identificado y clonado regiones antigénicas específicas de cada una de las toxinas ApxI-III, con un bajo nivel de homología entre ellas, y así, mediante las proteínas recombinantes obtenidas se ha desarrollado una prueba ELISA, que se ha sugerido podría ser capaz de detectar la respuesta humoral específica para cada una de las toxinas (Jung et al., 2019).

Estas pruebas ELISA también se han desarrollado como una potencial herramienta para evaluar la eficiencia de las vacunas basadas en toxinas ApxI-III (Giménez-Lirola et al., 2014; Jung et al., 2019; Shin et al., 2011), así como para la evaluación del nivel de anticuerpos maternos frente a las toxinas Apx en lechones procedentes de cerdas seropositivas por infección o vacunación (Giménez-Lirola et al., 2014; Kristensen et al., 2004a; Shin et al., 2011).

También ha sido evaluado un inmunoensayo de fluorescencia con microesferas multiplex (FMIA) para la detección simultánea de anticuerpos frente a las toxinas ApxI-IV con una sensibilidad y especificidad más elevada que otras pruebas serológicas, con la ventaja de necesitar menores volúmenes de muestra y una reducción del tiempo y coste del análisis (Giménez-Lirola et al., 2014).

Actualmente, hay disponibles kits comerciales que utilizan como antígenos la toxina ApxI (presente en los serotipos 1, 5, 9, 10, 11, 14 y 16) y la proteína de superficie Tbp2 (para la detección del resto de serotipos), aunque presentan el inconveniente de que estos dos antígenos no son específicos de *A. pleuropneumoniae*, por lo que también podrían dar lugar a reacciones cruzadas con otras bacterias (Gottschalk, 2015; Opriessnig et al., 2013).

Por el contrario, las pruebas ELISA basadas en la detección de anticuerpos contra la toxina ApxIV sí que pueden ser consideradas como APP específicas, por ser considerado este antígeno como específico de *A. pleuropneumoniae*, siendo además compartido por todos los serotipos de esta bacteria (Dreyfus et al., 2004). Esta prueba ELISA es capaz de detectar los anticuerpos en una media de tres semanas post-infección (este tiempo puede ser variable, pudiendo ser más elevado en algunos animales) en rebaños naturalmente infectados con y sin síntomas clínicos y/o lesiones, por lo que se ha sugerido que esta prueba ELISA puede detectar animales con la forma aguda o crónica de la enfermedad, así como con la forma subclínica, presentando una elevada sensibilidad y especificidad (Dreyfus et al., 2004; Eamens et al., 2012b). No obstante, hay que

tener en cuenta que algunos portadores subclínicos de la bacteria, colonizados únicamente a nivel tonsilar, podrían inducir niveles muy bajos de anticuerpos frente a las toxinas y por tanto no ser detectados (Chiers et al., 2002b; Dreyfus et al., 2004; Eamens et al., 2012b), así como también hay que tener en cuenta que la respuesta cuantitativa no está correlacionada con la gravedad de los signos clínicos o las lesiones observadas en el animal (Eamens et al., 2012b).

Se ha descrito una secuencia de inserción (ISAp1) en el gen *apxIVA* de algunas cepas del serotipo 7 de la bacteria, que evitan que esta produzca una toxina ApxIV funcional, y por tanto evita que se produzca una respuesta inmune frente a la toxina en animales infectados, lo que tiene como consecuencia que estos animales infectados sean indetectables mediante el uso de técnicas serológicas basadas en la detección de anticuerpos frente a la toxina ApxIV (Tegetmeyer et al., 2008).

Existe un kit ELISA comercialmente disponible frente a la toxina ApxIV, recomendándose su uso para monitorizar rebaños considerados libres de todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae*, o para chequear rebaños de estatus desconocido frente a la enfermedad (Broes et al., 2007). Se ha observado en un estudio con este kit una elevada especificidad, pero una relativamente baja sensibilidad, al menos en las condiciones testadas (Opriessnig et al., 2013), con lo cual la interpretación de resultados debería realizarse con precaución cuando estamos tratando de muestras procedentes de rebaños infectados a nivel subclínico (Gottschalk, 2015).

Este kit ELISA también ha sido utilizado para detectar anticuerpos frente a la toxina ApxIV a partir de fluidos orales de animales experimentalmente infectados, observándose incrementos significativos en la IgG a partir de los días 14-21 post-infección, sugiriéndose además en este estudio que los puntos de corte de los valores S/P establecidos por el fabricante para su uso en suero podrían ser demasiado elevados para la interpretación de los resultados procedentes de fluidos orales (González et al., 2017).

En una comparativa entre los diferentes kits comercialmente disponibles, se ha observado que la seroconversión medida con una prueba ELISA basada en el antígeno ApxIV es más tardía que con una prueba ELISA basada en los antígenos LPS, sugiriéndose que este hecho podría ser debido a que los anticuerpos frente a la

toxina se desarrollan más tarde que los anticuerpos frente a los LPS (Opriessnig et al., 2013). En cualquier caso, la sensibilidad más alta observada con estas técnicas ELISA fue de un 74% (sobre la base de animales individuales), si bien las especificidades llegaron al 100%, lo que nos indica que para la clasificación de una granja como libre de la enfermedad mediante el uso de técnicas serológicas, se debería muestrear un número sustancial de animales, especialmente en casos de baja prevalencia de la infección (Gottschalk, 2015; Opriessnig et al., 2013). Así, para la correcta determinación serológica del estatus frente a APP de una granja se ha recomendado el análisis de unos 30 animales (Dunlop & Mcorist, 2021).

Por otro lado, mediante el uso de técnicas ELISA, ocasionalmente se han observado resultados falsos positivos, en los que para clarificar el estatus del animal es esencial emplear técnicas bacteriológicas como aislamiento mediante el uso de medios selectivos o separación inmunomagnética, o bien emplear técnicas de diagnóstico molecular por PCR (Broes et al., 2007).

Es importante destacar que los animales asintómicamente infectados (portadores subclínicos) por *A. pleuropneumoniae* en el tracto respiratorio superior, son capaces de transmitir la infección, por lo que la detección de dichos animales es indispensable para prevenir la entrada de la enfermedad en un rebaño (Chiers et al., 2002b; Gottschalk, 2015), sin embargo este tipo de animales no siempre desarrollan anticuerpos, lo que hace que la serología sea menos útil para la detección de animales portadores a nivel nasal o tonsilar (Chiers et al., 2002b; Opriessnig et al., 2013), sin embargo mediante PCR de cultivos a partir de tonsila sí que se puede ser capaz de detectar estos animales portadores, por lo que se ha recomendado su uso en la monitorización de granjas negativas frente a la pleuroneumonía porcina (Chiers et al., 2002b).

2.1.8. Tratamiento

La terapia antibiótica es efectiva en la fase inicial de la enfermedad, cuando puede reducir la mortalidad, debiéndose administrar por vía parenteral (subcutánea o intramuscular), ya que los animales afectados no pueden beber o comer en esta fase de la enfermedad (Gottschalk & Broes, 2019; Sassu et al., 2018), así como también hay que tener en cuenta la farmacocinética y propiedades del tratamiento aplicado para establecer la dosis e intervalos más apropiados de cara a asegurar una concentración

efectiva y duradera (Dorey et al., 2017a; Gottschalk & Broes, 2019; Sassu et al., 2018). Por tanto, el éxito del tratamiento depende en gran medida de una detección temprana de los signos clínicos y de una rápida intervención terapéutica, ofreciendo con frecuencia la combinación de administración parenteral y oral de la terapia antibiótica los mejores resultados (Gottschalk & Broes, 2019).

No obstante, se ha observado en algunos estudios que el uso de antibióticos muy efectivos durante las fases muy iniciales de un brote podría impedir que se generase inmunidad protectora por parte de los animales, quedando éstos expuestos de nuevo a la enfermedad (Sjölund et al., 2009; 2011a). Sin embargo, se ha postulado que el uso de antibióticos que se muestren menos efectivos frente a la bacteria podría permitir que se generase una respuesta inmune protectora en los animales, con lo que tras una nueva exposición a la bacteria no se verían afectados clínicamente de una forma severa (Sjölund et al., 2009; 2011a). Por tanto, se ha sugerido que los signos clínicos de la pleuroneumonía podrían reducirse a lo largo del tiempo mediante el uso de antibióticos efectivos, pero que no impidan el desarrollo de la respuesta inmune, con lo que los animales quedarían protegidos durante el resto del periodo de crecimiento, incluso aunque la bacteria continuase transmitiéndose (Sjölund et al., 2009).

Las medicaciones estratégicas pueden ser establecidas en los periodos de más alto riesgo, que puede ser identificado mediante los exámenes clínicos y post-mortem de rutina, así como con perfiles serológicos a nivel de rebaño (Gottschalk & Broes, 2019). También se ha sugerido que la transmisión de *A. pleuropneumoniae* de las cerdas reproductoras a sus lechones podría ser atenuada mediante el uso de antibióticos altamente efectivos, como fluoroquinolonas, aplicados previamente a la entrada de las cerdas a las salas de lactación, con lo que se podrían reducir los signos clínicos de la pleuroneumonía porcina en fases productivas posteriores de la vida del lechón (Sjölund et al., 2009), e incluso se podría llegar a evitar la colonización de los lechones, tal y como sugiere un estudio, mediante el uso de tildipirosina en cerdas al parto y en sus lechones, siendo aplicada en estos cada 7 días, desde el primer día de vida hasta el destete a los 21 días (Kuchiishi et al., 2023).

En cualquier caso, la terapia antibiótica no elimina la infección de un rebaño, quedando animales portadores durante periodos muy largos, siendo éstos una fuente de infección para el resto de sus congéneres (Gottschalk & Broes, 2019).

Entrando ya en la actividad específica de los diferentes antibióticos estudiados por diversos autores y estudios, si bien la actividad de la tulatromicina es tiempo dependiente, observándose en un modelo de infección de tejidos in vivo, que el tiempo de exposición y la capacidad bactericida frente a *A. pleuropneumoniae* están positivamente correlacionados, y el tiempo durante el cual el fármaco permanece por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI) es el mejor índice para describir su actividad antibacteriana, con un 99,9% de actividad bactericida cuando el valor de dicho índice era de 96,38 (L. Yao et al., 2022), otros autores han observado que este antibiótico, a pesar de que por sus características farmacocinéticas, con una única dosis es al menos tan efectivo como 3 dosis diarias de ceftiofur, en base a lesiones pulmonares, ganancia media diaria, duración de los síntomas clínicos y temperatura rectal en animales desafiados experimentalmente con *A. pleuropneumoniae* (Hart et al., 2006), incluso siendo administrado a doble dosis no es capaz de eliminar la bacteria de la tonsila de animales portadores subclínicos (Angen et al., 2008).

De igual modo, la tilmicosina, que siendo también un antibiótico que se ha mostrado en algunos estudios como eficaz administrado vía oral para el control y prevención de la enfermedad (Dong et al., 2020; M.-A. Paradis et al., 2004), posteriormente a su administración se observa que, si bien se reduce la presencia de la bacteria en la superficie tonsilar, es incapaz de eliminarla completamente de las criptas tonsilares, y por tanto evitar la excreción de la bacteria por animales portadores (Fittipaldi et al., 2005).

En cualquier caso, según muestran diversos estudios parece evidente que la elección del antibiótico a utilizar debería estar basada en su CMI así como en sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (PK/PD), siendo efectivos frente a este patógeno un amplio rango de antimicrobianos (Gottschalk & Broes, 2019; Sassu et al., 2018; Vilaró et al., 2020), mostrándose particularmente efectivos enrofloxacin (Grandemange et al., 2017; Sjölund et al., 2009), marbofloxacin (Grandemange et al., 2017), tilmicosina (Dong et al., 2020; M.A. Paradis et al., 2004), tulatromicina (Hart et al., 2006), florfenicol (Papatsiros et al., 2019), ceftiofur (Hart et al., 2006), tildipirosina (Kuchiishi et al., 2023) y gamitromicina (Papatsiros et al., 2019).

No obstante, la elección del tratamiento antimicrobiano para el tratamiento de la enfermedad debería ser cuidadoso, especialmente en el caso de antibióticos considerados críticos como las fluoroquinolonas (Sassu et al., 2018).

En este sentido, se ha utilizado el modelo de simulación de Monte Carlo (MCS) para predecir la dosis óptima de marbofloxacin y ceftiofur, en base a sus datos de farmacocinética y farmacodinámica, junto con la CMI de *A. pleuropneumoniae* para estos antibióticos, método que podría ser extensible al resto de antibióticos (Dorey et al., 2017b; Sun et al., 2020).

Guarneri et al. han observado en un estudio retrospectivo llevado a cabo en Italia que la susceptibilidad de *A. pleuropneumoniae* a los antibióticos es altamente dependiente del serotipo (Guarneri et al., 2024), así como diversos estudios llevados a cabo en diferentes países han sugerido que la susceptibilidad de *A. pleuropneumoniae* a los antimicrobianos varía a lo largo del tiempo, por lo que se enfatiza la necesidad de realizar una monitorización continua, con el objetivo de controlar el incremento de las resistencias a los antimicrobianos que actualmente se utilizan, así como también se refleja la importancia de realizar antibiogramas caso por caso para establecer las pautas de tratamiento más efectivas (Gutiérrez-Martín et al., 2006; Holmer et al., 2019; Siteavu et al., 2023; Vanni et al., 2012; Vilaró, Novell, Enrique-Tarancon, Baliellas, & Fraile, 2023), en este sentido, se ha observado como en España la sensibilidad de *A. pleuropneumoniae* a antibióticos de último recurso como cefalosporinas y fluoroquinolonas se ha mantenido estable o incluso se ha incrementado durante el periodo desde 2019 a 2022 (Vilaró, Novell, Enrique-Tarancon, Baliellas, Migura-García, et al., 2023).

Sin embargo, Vilaró et al. han evidenciado mediante estudios filogenéticos, aplicando técnicas de secuenciación completa (WGS), el link epidemiológico existente dentro de las diferentes estructuras productivas de la misma integración vertical, observando cómo los mismos clones de *A. pleuropneumoniae* persisten durante varios años en las diferentes granjas vinculadas, conservándose tanto las CMI como los perfiles de resistencia a los diferentes antibióticos detectadas en dichos clones, recomendando aplicar dichos vínculos epidemiológicos dentro de una estructura a la hora de establecer los tratamientos antibióticos más apropiados (Vilaró et al., 2024), reseñando por otro lado la detección de otros clones con alta variabilidad entre las diferentes granjas de la estructura productiva, posiblemente relacionados con los cambios que se producen en las líneas genéticas a través de la adquisición de nuevos animales, que podrían haber introducido estos nuevos clones, recomendando por tanto tener en cuenta el riesgo de introducir nuevos clones de *A. pleuropneumoniae* a la hora de cambiar las líneas genéticas de las granjas (Vilaró et al., 2024). Esto último, podría explicar que

anteriormente se haya reportado por Dayao et al. que la susceptibilidad de *A. pleuropneumoniae* a los antimicrobianos puede ser variable entre los animales de una misma granja, tanto entre diferentes lotes, como dentro de un mismo lote e incluso entre diferentes aislados de un mismo animal, de tal modo que se haya sugerido que para determinar el estatus de susceptibilidad a antimicrobianos dentro de un lote o de una granja deberían ser muestreados diferentes animales, con múltiples aislados de cada animal (Dayao et al., 2015).

En un estudio de susceptibilidad de *A. pleuropneumoniae* a diferentes antibióticos realizado en España, se observó en los aislados estudiados una elevada susceptibilidad (>90%) a ceftiofur, florfenicol, tilmicosina, tildipirosina y tulatromicina; una susceptibilidad intermedia (>60% y <90%) a amoxicilina y enrofloxacin, así como una baja susceptibilidad (<60%) a doxiciclina (Vilaró et al., 2020), estando acorde tanto la alta susceptibilidad a ceftiofur, florfenicol y tulatromicina, como la baja susceptibilidad a la doxiciclina con otros estudios que también han mostrado un elevado nivel de resistencias a tetraciclinas (Archambault et al., 2012; Guarneri et al., 2024; Gutiérrez-Martín et al., 2006; Kucerova et al., 2011; Nadeau et al., 1988; Siteavu et al., 2023; Somogyi et al., 2023; Vanni et al., 2012); observándose un incremento a lo largo del tiempo de las resistencias no solo a tetraciclinas, sino también a otros antibióticos como gentamicina, β -lactámicos y tilmicosina (Gutiérrez-Martín et al., 2006; Siteavu et al., 2023; Vanni et al., 2012), detectándose la existencia de aislados que presentan multirresistencias a varios antibióticos (Archambault et al., 2012; Kim et al., 2016).

Por otro lado, también se ha observado una elevada correlación y una CMI similar entre antibióticos de la misma familia para *A. pleuropneumoniae*, como enrofloxacin y marbofloxacin (fluoroquinolonas de segunda y tercera generación), sugiriéndose la existencia de mecanismos de resistencia cruzada para fluoroquinolonas, no observándose dichas resistencias cruzadas entre otras familias de antibióticos como macrólidos o aminoglucósidos (Vilaró et al., 2022).

El potencial de formación de biofilm por parte de *A. pleuropneumoniae* se ha demostrado por varios estudios como juega un importante papel en la aparición de niveles elevados de resistencias a antimicrobianos (Archambault et al., 2012; Y. Li et al., 2016c; Pereira et al., 2018), observándose que los aislados de *A. pleuropneumoniae* que crecen en biofilm son de 100 a 30.000 veces más resistentes a los antimicrobianos que cuando son aislados de crecimiento planctónico, señalando que, si bien la

determinación de la CMI es la técnica Gold Standard para establecer la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias planctónicas patógenas, con frecuencia estas concentraciones de antibióticos no serían las requeridas para eliminar las bacterias cuando estén presentes formando biofilm (Archambault et al., 2012).

La concentración preventiva de mutantes (MPC) se ha definido como la concentración de un antimicrobiano que bloquea el crecimiento de subpoblaciones mutantes de bacterias que presentan resistencia al mismo, que espontáneamente aparecen cuando hay densidades bacterianas de 10^7 - 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC), como las que se ven durante una infección, así pues, las concentraciones de antibióticos que no inhiben suficientemente este crecimiento bacteriano, resultan en la amplificación selectiva de cepas con una susceptibilidad a los antibióticos reducida (Blondeau & Fitch, 2019). En este sentido, se ha definido la ventana de selección de mutantes (MSW) como la diferencia entre la MIC que localiza en la parte baja de la ventana y la MPC que se localiza en la parte alta (Zhang et al., 2023a). Así pues, se ha reportado en diversos estudios in vitro sobre aislados clínicos de *A. pleuropneumoniae* la MPC de ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, tilmicosina y tulatromicina, para determinar la concentración de estos antibióticos a la que se bloquea el crecimiento de bacterias resistentes en cultivos de elevada densidad, siendo esta concentración más baja para ceftiofur y enrofloxacin de entre los antimicrobianos estudiados (Blondeau & Fitch, 2019), así como también ha sido estudiado para danofloxacin, sugiriendo que las concentraciones de antibióticos localizadas en la parte más baja de la MSW (alrededor de la MIC) deberían ser evitadas a la hora de diseñar una correcta pauta de tratamiento para evitar la aparición de cepas resistentes (Zhang et al., 2023a).

En un estudio llevado a cabo mediante secuenciación de genoma completo (WGS), en el que se evaluó la correlación entre el perfil de resistencias antimicrobianas (AMR) de 96 aislados de *A. pleuropneumoniae* y la identificación de genes de AMR para 9 antimicrobianos, se observó que excepto para los macrólidos testados, una elevada CMI estaba altamente correlacionada con la presencia de genes de AMR en ampicilina, enrofloxacin, florfenicol, sulfisoxazol, tetraciclina y trimetoprim (Bossé et al., 2017). Por tanto, la WGS se ha propuesto como un método que podría ser utilizado, sólo o en combinación con las pruebas fenotípicas, para la vigilancia de resistencias antimicrobianas en *A. pleuropneumoniae*, así como para estudiar los mecanismos de diseminación de estas, entre los que cabe destacar el papel de los plásmidos (Bossé et al., 2017; Ke et al., 2024; Vilaró et al., 2024). En este sentido, se han reportado por

diversos estudios la existencia de genes que codifican para resistencias a diversos antimicrobianos como tetraciclinas, β -lactámicos, anfenícoles, aminoglicosidos, quinolonas y sulfonamidas (Archambault et al., 2012; Bossé et al., 2017; Guitart-Matas et al., 2022; Kim et al., 2016; Kucerova et al., 2011; Ma et al., 2021; Pereira et al., 2018; Wang et al., 2020b; X. Yao et al., 2023), sugiriendo que la transferencia horizontal de plásmidos es una vía importante para la diseminación de estos genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas de APP (Guitart-Matas et al., 2022; X. Yao et al., 2023).

No obstante, algunos de estos estudios también han puesto de manifiesto que para algunos antibióticos la concordancia entre los resultados genotípicos y fenotípicos obtenidos mediante WGS no es siempre la idónea, con lo que recomiendan para la rutina diagnóstica de determinación de resistencias para *A. pleuropneumoniae* la aplicación de las técnicas estandarizadas disponibles para la determinación de la CMI (Ke et al., 2024; Vilaró et al., 2024).

Así, en un estudio realizado sobre granjas que habían utilizado una dosis de enrofloxacin, en el marco de planes de erradicación frente a *A. pleuropneumoniae* (junto con protocolos de despoblación parcial), se ha observado una diseminación de cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) resistentes a este antibiótico, desde las cerdas originalmente tratadas, al medio ambiente y a sus camadas, persistiendo estas cepas resistentes incluso años después del tratamiento, aún en ausencia de exposición a quinolonas (Kaspersen et al., 2020).

Debido al incremento que se observa a nivel global en el nivel de resistencias a antimicrobianos, hay una clara necesidad de encontrar nuevas alternativas al uso de éstos para el tratamiento de las infecciones por *A. pleuropneumoniae*. Así, se ha estudiado la eficacia contra este patógeno de diversas sustancias como el péptido antimicrobiano MPX, obtenido del veneno de avispas, tanto *in vitro* como en un modelo murino (Wang et al., 2020a), si bien ya se han reportado resistencias por parte de la bacteria a otros péptidos antimicrobianos como el PR-39 (Xie et al., 2017b).

Otros estudios han explorado el uso de aceites esenciales aislados de plantas y especias, observando que los aceites esenciales procedentes de la canela, cilantro, menta, hierbabuena, tomillo, mejorana, eucalipto y laurel presentaban actividad bacteriostática y bactericida frente a diferentes aislados de APP, llegando algunos de ellos incluso a tener propiedades antibiofilm; reseñando que estas propiedades bactericidas y antibiofilm parecen estar asociadas con la presencia en estos extractos de

monoterpenos y fenilpropanoides, que podrían abrir nuevas vías de trabajo para el desarrollo de productos antibacterianos activos frente a esta y otras bacterias (Rodrigues et al., 2023).

También se ha experimentado con el uso de polifenoles del té, observándose tanto *in vitro* como en un modelo murino, una elevada eficacia inhibiendo el crecimiento de *A. pleuropneumoniae in vitro*, así como confiriendo una elevada protección frente a una dosis letal de la bacteria, sugiriéndose que este efecto protector podría estar relacionado con una inhibición de la capacidad de la bacteria para adherirse a las células de epitelio traqueal, promoviendo además la expresión de proteínas de unión para conservar la integridad de dicha barrera, así como mediante la inhibición de las rutas metabólicas que dan lugar a la liberación de citoquinas que se produce durante la respuesta inflamatoria (X. Li et al., 2023).

También han sido estudiadas experimentalmente otras vías de protección frente a la enfermedad ocasionada por *A. pleuropneumoniae*, basadas en el incremento de la resistencia a la infección mediante el uso de defensas, proteínas que aumentan la eficiencia del sistema inmune innato frente a infecciones bacterianas, a través de estrategias como la sobreexpresión de β -Defensina Porcina 2 (PBD-2) en cerdos transgénicos o la administración de β -Defensina Bovina 5 a nivel intranasal en ratones, resultando ambas en un incremento de la resistencia a la enfermedad por parte de los animales, observándose en ambos casos una reducción de la carga bacteriana en pulmón, así como una marcada reducción de las lesiones pulmonares (J. Huang et al., 2024; X. Yang et al., 2015).

2.1.9. Inmunoprofilaxis

Las vacunas actuales frente a *A. pleuropneumoniae* son una herramienta para disminuir la sintomatología clínica y las lesiones provocadas por la enfermedad, si bien no pueden proteger frente a la infección o transmisión de la bacteria, así como no pueden eliminar el estado de portador (Gottschalk & Broes, 2019).

Diversos estudios muestran como mediante el uso de vacunas se pueden mejorar parámetros como morbilidad y mortalidad, se reduce el uso de antimicrobianos, se reduce el nivel de lesiones pulmonares, mejora la ganancia media diaria, así como mejora el índice de conversión, mejorando también la calidad de la canal, con menos

decomisos debidos a neumonías y pleuritis (Hölzen et al., 2021; Mortensen et al., 2022; Overbeke et al., 2001; Sipos et al., 2021; Sjölund & Wallgren, 2010; Tumamao et al., 2004b).

No obstante, también se han reportado estudios de campo en los que estas mejoras no han sido evidentes, bien por una posible interacción con la inmunidad maternal (Jirawattanapong et al., 2008), o bien porque fue necesario el uso de antibióticos para el control de la enfermedad, por lo que se sugirió como posible estrategia de control el uso combinado de la vacunación junto con antimicrobianos (Sjölund & Wallgren, 2010).

La estrategia vacunal más aceptada frente a la enfermedad, tal y como sugieren diversos estudios y autores, consiste en la vacunación de lechones una vez que ha declinado la inmunidad maternal, idealmente entre las semanas 10 y 14, para evitar la posible interferencia entre ambas (Gottschalk & Broes, 2019; Jirawattanapong et al., 2008; Sjölund & Wallgren, 2010). Si bien en función de las circunstancias y de los objetivos de la vacunación, las cerdas reproductoras, así como la reposición antes de su entrada en granja, también podrían ser vacunadas (Gottschalk & Broes, 2019).

En cuanto a los diferentes tipos de vacunas o estrategias vacunales disponibles podemos agruparlas en (Ramjeet et al., 2008):

2.1.9.1. Bacterinas o vacunas de primera generación

Son vacunas que contienen la bacteria inactivada y su modo de acción está basado en la generación de anticuerpos frente a los polisacáridos capsulares presentes en la pared de la bacteria (Ramjeet et al., 2008), por tanto, estas vacunas generan una protección serotipo específica frente a los serotipos que incluye la vacuna, ya que no se genera una protección cruzada entre los diferentes serotipos (Fenwick & Osburn, 1986). Así pues, su uso tiene sentido en granjas en las que ha sido identificado el serotipo causante del problema y coincide con el serotipo incluido en la vacuna (Gottschalk & Broes, 2019). Este tipo de vacunas genera una protección parcial, con una ligera reducción de la mortalidad, que podría ser explicado por la ausencia de proteínas altamente inmunogénicas y esenciales para la protección como las toxinas Apx, así como por la alteración durante el proceso de inactivación de las características antigénicas de ciertos factores de virulencia asociados a la bacteria (Ramjeet et al., 2008).

Actualmente hay en el mercado algunas vacunas a base de bacterinas, si bien estas incluyen únicamente dos o tres serotipos diferentes (A. Loera-Muro & Angulo, 2018; Ramjeet et al., 2008). La vacunación de cerdas reproductoras con bacterinas serotipo específicas puede ayudar a reducir o retrasar la colonización de los lechones, lo que puede llevar a una reducción, bajo determinadas circunstancias, de los signos clínicos en la fase de crecimiento y cebo (Gottschalk & Broes, 2019), aunque también se ha sugerido que su uso en animales en crecimiento puede conferir protección frente a la colonización y lesiones producidas por la bacteria (Dunlop & Mcorist, 2021).

Con este mismo sentido, también se utilizan vacunas autógenas, que se obtienen mediante el crecimiento de la bacteria obtenida a través de muestras procedentes de la granja infectada y su posterior inactivación, no obstante, según en función de la normativa de cada país, su uso suele estar restringido a la granja de la que han sido aisladas las muestras (Dunlop & Mcorist, 2021; Gottschalk & Broes, 2019; A. Loera-Muro & Angulo, 2018).

2.1.9.2. Vacunas de segunda generación o de subunidades

Son vacunas que contienen las toxinas Apx I, II, y III (Ramjeet et al., 2008), así como también pueden contener otros componentes de la bacteria como proteínas de la membrana externa (Omp), proteínas de unión a transferrina (Tbp), o incluso la bacterina, denominándose en este último caso como vacunas mixtas (Hölzen et al., 2021; Mortensen et al., 2022; Overbeke et al., 2001; Tumamao et al., 2004b). El uso de toxinas Apx como inmunógenos ha sido propuesto en varios estudios con desafío experimental de animales inmunizados con toxinas (Devenish et al., 1990; Overbeke et al., 2001; Seo et al., 2011; Shao et al., 2010). En este caso, las vacunas generan la inmunidad frente a las toxinas Apx, su modo de acción está basado en la generación de anticuerpos neutralizantes frente a dichas toxinas, de forma que protegen a los neutrófilos de ser destruidos por la bacteria, y por tanto permitiéndoles destruir las bacterias fagocitadas (Ramjeet et al., 2008). Así, cuando la bacteria comienza a multiplicarse en pulmón y liberar las toxinas al medio externo, estos anticuerpos son capaces de neutralizarlas, con lo cual esta protección es independiente del serotipo involucrado (Shao et al., 2010), tal y como se ha observado en ensayos de eficacia con vacunas mixtas (comerciales y candidatos experimentales) en base a reducción de lesiones pulmonares frente a diferentes serotipos (Mortensen et al., 2022; Zhang

et al., 2022a). En este caso, hay que considerar que se continúa produciendo la transmisión y multiplicación de la bacteria, y que, si bien las toxinas Apx son el factor de virulencia más importante, también existen otros factores de virulencia, con lo cual es posible observar cierta sintomatología clínica e incluso mortalidad en algunos de los animales vacunados (Ramjeet et al., 2008). Estas vacunas también presentan la ventaja de ser vacunas DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals), es decir, se pueden diferenciar serológicamente los animales vacunados de los animales infectados, mediante la detección de anticuerpos frente a la toxina ApxIV, que estarían presente en los animales infectados, pero no se detectarían en los animales vacunados, ya que esta toxina no se encuentra presente en las vacunas comercialmente disponibles en la actualidad (Sassu et al., 2018).

Se ha sugerido que los anticuerpos inducidos frente a determinadas proteínas de *A. pleuropneumoniae* podrían atenuar el efecto protector de los anticuerpos generados frente a las toxinas Apx, como parece suceder con las proteínas de la membrana externa PalA y Apfa, lo que debería ser tenido en cuenta en el desarrollo de este tipo de vacunas (Shao et al., 2010; Van Den Bosch & Frey, 2003).

Por otro lado, actualmente existen múltiples vías de investigación para el desarrollo de nuevas vacunas frente a la pleuroneumonía porcina, basadas en diferentes estrategias:

- Vacunas vivas atenuadas. El uso de vacunas vivas atenuadas ha sido propuesto como vía de investigación para el desarrollo de vacunas frente a esta enfermedad, tras observar que la exposición a la bacteria viva o a variantes atenuadas mediante delección de genes, generan una inmunidad de tipo homólogo y heterólogo, así como una protección efectiva frente al desafío experimental (Inzana et al., 1993; Nielsen, 1979; Xie et al., 2017a; Yuan et al., 2014). No obstante, a pesar de los buenos resultados obtenidos experimentalmente, posiblemente debido al riesgo que conlleva la reversión a la virulencia por parte de las vacunas vivas atenuadas, así como las regulaciones existentes en lo que a organismos modificados genéticamente se refiere, estos resultados positivos no han tenido la relevancia suficiente para que se hayan desarrollado vacunas comercialmente disponibles (A. Loera-Muro & Angulo, 2018).

- Nuevos sistemas de expresión, para la producción de antígenos recombinantes que puedan ser utilizados como candidatos vacunales:
 - Bacterianos: *E. coli* ha sido utilizada como vehículo para la producción de fragmentos inmunógenos de la toxina ApxII (Seo et al., 2011), también para la producción de una proteína Apx recombinante contenida en una vesícula de la membrana externa (OMV) (Xu et al., 2018), así como para la expresión de una proteína recombinante quimérica, desarrollada experimentalmente, que expresa antígenos de *A. pleuropneumoniae* y de *Mycoplasma hyopneumoniae*, con el objetivo de inducir protección frente a ambos patógenos (Lee et al., 2014).
 - Levaduras, como una cepa de *Sachaeromyces cerevisiae*, que expresa las toxinas ApxI o II, para poder ser administrada para la inmunización por vía oral (Shin et al., 2013).
- Desarrollo de vacunas para ser aplicadas por diferentes vías:
 - Vacunas para administración oral, como una vacuna que incluye las toxinas ApxI-III como antígenos, incorporada a un gel de monooleína para poder ser administrada oralmente (Lopez-Bermudez et al., 2014).
 - Vacunas para aplicación intranasal, mediante vehículos que permiten aplicar toxina ApxII o fragmentos recombinantes de la misma, bajo la premisa de que la administración intranasal de vacunas podría inducir una respuesta más potente que la inmunización subcutánea o intramuscular (H. S. Li et al., 2016a; Park et al., 2015).
 - Vacunas para ser aplicadas por vía intradérmica, en este caso una vacuna mixta comercial con adyuvante oleoso y de aplicación intramuscular, que, si bien aplicada por vía intradérmica muestra eficacia en la reducción de lesiones pulmonares, se desaconseja su uso por reacciones locales adversas a nivel de piel en el punto de aplicación (Jarosova et al., 2023).
- Vacunas vectorizadas, como una vacuna viva atenuada consistente en una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, aplicada intranasalmente, que expresa como antígenos las proteínas Apx I-III, junto con una proteína de la membrana externa (OmpA) (Hur et al., 2016).

- Detección de nuevos antígenos, que podrían ser utilizados para el desarrollo de nuevas vacunas, así pues, se han evaluado experimentalmente nuevos candidatos a antígenos vacunales como lipoproteínas presentes en la bacteria (Cao et al., 2020; Chung et al., 2012), otros antígenos que se ha detectado que se inducen *in vivo* una vez que se produce la infección (Zhang et al., 2016), proteína ApxIV recombinante, que podría ser adicionada a las vacunas existentes o a nuevas vacunas (H. C. Wu et al., 2018), así como vesículas que son excretadas a partir de la membrana externa (OMV) que han mostrado ser muy inmunogénicas y con características antigénicas similares a las proteínas de la membrana externa (Omp) de la bacteria (Antenucci et al., 2017, 2018). Aunque, si bien la mayor parte de estos nuevos antígenos se han mostrado como inmunógenos, tras el desafío experimental en animales que habían sido inmunizados previamente, no han mostrado éxito en cuanto a la prevención de la infección por parte de la bacteria, ni en cuanto a la reducción de las lesiones en pulmón (Antenucci et al., 2018).

También han sido utilizadas por varios estudios técnicas de inmunoproteómica para la búsqueda y detección de nuevos antígenos de entre las proteínas de la bacteria con características altamente inmunogénicas (Antenucci et al., 2019; Buettner et al., 2011; Chung et al., 2012; Stancheva et al., 2022), así como técnicas de ingeniería genética en cepas de bacterias recombinantes, capaces de expresar y exponer antígenos seleccionados en su membrana externa (Antenucci et al., 2020).

- Desarrollo de nuevos adyuvantes, que potencien la respuesta inmune de los antígenos empleados frente a *A. pleuropneumoniae*, como la flagelina (fragmento N terminal de flagelina) que se ha observado que genera un incremento de la inmunogenicidad y de la eficacia de un antígeno en base a la proteína ApxII, sugiriéndose su utilidad en formulaciones vacunales (Chuekwon et al., 2022).

2.2. La inmunidad maternal frente a *Actinobacillus pleuropneumoniae*

2.2.1. La inmunidad de origen maternal en el lechón

Los lechones nacen con un sistema inmune adaptativo de mucosas y sistémico inmaduro, caracterizado por un número limitado de linfocitos periféricos, nódulos linfáticos subdesarrollados y con un bajo número de linfocitos T efectoros y de memoria (Šinkora & Butler, 2009). Además, la placenta de la especie porcina es de tipo epiteliochorial (Leiser & Kaufmann, 1994), lo que excluye cualquier tipo de transferencia de inmunidad a través de esta, siendo por tanto los lechones agammaglobulinémicos al nacimiento, y aunque inmunocompetentes, no pueden desarrollar una rápida respuesta inmune a nivel sistémico o de mucosas (Salmon et al., 2009). Por este motivo, su supervivencia frente a patógenos depende de la adquisición de inmunidad maternal a través de la ingestión de calostro durante las primeras horas de vida (Poonsuk & Zimmerman, 2018; Salmon et al., 2009).

Toda la IgG, un 85% de la IgM y un 40% de la IgA presente en el calostro se ha demostrado estar derivada del suero de la cerda, siendo el resto producido en el parénquima mamario, por lo que se puede considerar al calostro como un trasudado y no una verdadera secreción (Bourne & Curtis, 1973).

La absorción de calostro por parte del lechón se produce durante un tiempo determinado, así, esta absorción a nivel de duodeno se produce durante unas 3 horas, a nivel de yeyuno durante unas 48 horas, y llegando a producirse hasta las 72 horas a nivel de íleon (Murata & Namioka, 1977), siendo los anticuerpos calostrales (IgG) detectables en el sistema circulatorio del recién nacido a partir de las 48 horas tras el nacimiento (Watson, 1980; Wilson et al., 1989).

En la cerda al momento del parto, la concentración de IgG en el calostro puede ser tres veces más elevada que en suero, constituyendo este isotipo más del 80% del contenido en inmunoglobulinas calostrales (Curtis & Bourne, 1971), esto da lugar a que los niveles de IgG en suero de los lechones, durante el encalostado, puedan ser más elevados que en su progenitora, y explica porque cerdas seronegativas para ciertos patógenos podrían dar lugar a neonatos seropositivos para los mismos (Poonsuk & Zimmerman, 2018).

No obstante, la cantidad de anticuerpos maternos transferidos por la cerda a sus lechones no solamente depende del nivel de inmunidad de la cerda en el momento del

parto, sino también de la cantidad de calostro ingerido por cada lechón, que a su vez también depende del tiempo de encalostrado (Klobasa et al., 1981).

En el lechón, los niveles de inmunoglobulinas en suero comienzan a disminuir a los dos días de vida, como consecuencia del catabolismo proteico y debido a un fenómeno de dilución por el incremento del peso y volumen, así, la tasa de disminución de la inmunidad materna se puede ver afectada por diferencias en la velocidad de crecimiento entre animales individuales (Curtis & Bourne, 1971). La vida media de estas IgG en el suero del lechón es de aproximadamente 14 días, decayendo durante un periodo superior a las 3 semanas (Curtis & Bourne, 1971).

La persistencia de los anticuerpos maternos en los lechones se puede determinar mediante detección a través de pruebas serológicas, siendo la duración de los anticuerpos la edad a la que los anticuerpos maternos caen por debajo del límite de detección de la prueba; así como a través de la tasa de caída o vida media de los anticuerpos maternos, que indica el tiempo en el que se produce una disminución del 50% del nivel de anticuerpos en el lechón medido mediante una prueba serológica, considerándose este último parámetro un valor constante y por tanto más apropiado para comparar datos entre diferentes estudios (Martínez-Boixaderas et al., 2022).

Se ha observado que la IgG de origen maternal regula negativamente la síntesis de inmunoglobulinas por parte del lechón (Klobasa et al., 1981), sugiriéndose que este efecto se podría deber a la neutralización de los antígenos cuando entran en el lechón por parte de estas IgG, o bien producirse mediante un efecto directo sobre los linfocitos B (Salmon et al., 2009). Se ha sugerido que los lechones no son inmunológicamente competentes hasta aproximadamente las 4 semanas de vida (Salmon et al., 2009).

Estas inmunoglobulinas derivadas del calostro, concretamente IgG e IgA pueden acceder a la superficie mucosa del tracto respiratorio del lechón recién nacido, por lo que algunos autores han destacado la importancia de la vacunación de las cerdas reproductoras con el objetivo de proteger a los lechones frente a las diferentes infecciones que se puedan producir, especialmente durante las primeras etapas de su vida (Nechvatalova et al., 2005, 2011).

También es en el tracto digestivo, a través de los espacios intercelulares del epitelio intestinal, donde tiene lugar la absorción de leucocitos singénicos presentes en el calostro, es decir, únicamente se absorben si proceden de la propia madre del lechón, necesitando en este caso un tiempo de encalostrado mínimo de 12 a 20 horas, y siendo

principalmente linfocitos, que alcanzan los nódulos linfáticos mesentéricos y otros tejidos linfoides y no linfoides (Tuboly et al., 1988).

Estos linfocitos, como células inmunocompetentes y presentadoras de antígenos, se ha sugerido que pueden transferir señales positivas y negativas al sistema inmune del lechón, regulando las actividades de los linfocitos B y T (Williams, 1993), así como proliferar como respuesta a estímulos antígeno específicos, aunque de forma limitada (Bandrick, et al., 2014a; Nechvatalova et al., 2011). No obstante, el conocimiento actual sobre el rol de estas células en la protección del lechón contra patógenos es aún limitado (Poonsuk & Zimmerman, 2018).

2.2.2. La inmunidad maternal frente a *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Nielsen (1995) observó que la presencia de anticuerpos frente al serotipo 2 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en calostro y en lechones lactantes de 4 días de vida estaba correlacionada con una protección completa frente al desafío con este serotipo (Nielsen, 1995), observándose por este y otros estudios, que la presencia de elevadas cantidades de anticuerpos calostrales en animales infectados reduce la cantidad de bacteria en las tonsilas y pulmón, así como su excreción al ambiente, considerándose como un factor de protección frente a la enfermedad (Chiers et al., 2002a; Nechvatalova et al., 2005; Nielsen, 1975, 1995; Vigre et al., 2002).

No obstante, se ha sugerido que el nivel inicial de anticuerpos maternos serotipo específicos frente a *Actinobacillus pleuropneumoniae* puede ser muy variable entre camadas, probablemente debido a la variación en el contenido de anticuerpos calostrales que hay entre las cerdas (Sjölund et al., 2011b; Vigre et al., 2003), pudiendo ser detectables hasta las 2 semanas de vida del lechón, llegando en algunos animales más allá de las 8 semanas, y reduciéndose a la mitad cada dos semanas; siendo su vida media de 1 a 3 semanas, con una gran variación individual, siendo por tanto los lechones susceptibles a la infección a las pocas semanas del nacimiento (Vigre et al., 2003). En este sentido, se ha observado en estudios posteriores, que esta concentración inicial de inmunoglobulinas es sustancialmente más elevada y duradera en lechones procedentes de cerdas con niveles elevados de anticuerpos a nivel sérico, que cuando proceden de cerdas con niveles bajos, sin estar influenciados estos niveles iniciales de inmunidad maternal por el peso de los lechones, excluyendo los animales no viables (Sjölund et al., 2011b).

No obstante, hay que tener en cuenta que estos valores pueden depender también de la sensibilidad de las pruebas serológicas utilizadas para detectar los anticuerpos (Gottschalk & Broes, 2019).

El isotipo predominante entre las inmunoglobulinas de origen maternal que se puede encontrar tanto a nivel sanguíneo como en fluido bronco-alveolar es IgG, probablemente debido a un mayor contenido de este isotipo en calostro, y como consecuencia del periodo de vida media más corto del resto de los isotipos, si bien también se pueden detectar IgM a nivel sanguíneo, así como IgA a nivel de fluido pulmonar (Krejci et al., 2005).

Se ha observado que a medida que la proporción de animales con elevadas concentraciones de anticuerpos calostrales frente a los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae* va decayendo, comienza a tener lugar una mayor transmisión horizontal de la bacteria, fenómeno que se suele producir entre las 4 y las 12 semanas de vida, indicándose la asociación entre el nivel de inmunidad maternal y la susceptibilidad de los animales a la infección (Vigre et al., 2002).

Por otro lado, los anticuerpos neutralizantes de origen maternal específicos frente a las toxinas Apx tienen una vida media de 4 a 6 semanas, pudiendo llegar a ser detectados en suero hasta las 12 semanas de vida (Chiers et al., 2002a; Cruijssen et al., 1995a,c). Se ha sugerido que los lechones pueden ser colonizados por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en presencia de anticuerpos frente a las toxinas Apx (Chiers et al., 2002a), aunque se ha observado que, en presencia de títulos elevados de los mismos, los animales están protegidos frente a la enfermedad, siendo por tanto la ausencia de anticuerpos frente a las toxinas Apx un indicativo de la susceptibilidad de los animales. Esto hace que los animales a partir de las 12 semanas de vida sean especialmente susceptibles a padecer la sintomatología de la pleuroneumonía porcina (Cruijssen et al., 1995a,c). Por otro lado, hay que tener en cuenta que estos anticuerpos neutralizantes frente a las toxinas Apx no son específicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, es decir, cerdas reproductoras expuestas a otras bacterias productoras de toxinas RTX como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* o *Actinobacillus suis* podrían generar anticuerpos maternos frente a estas toxinas (Devenish et al., 1989), que se ha sugerido que serían igualmente protectores frente a la enfermedad (Cruijssen et al., 1995c). Se ha observado que la vacunación de reproductoras con vacunas basadas en toxinas Apx, induce unos mayores niveles de anticuerpos maternos frente a estas toxinas en sus lechones, al

menos hasta las 3 semanas de edad, si bien es cierto que no se realizaron muestreos en animales de mayor edad (Kristensen et al., 2004a).

Teniendo en cuenta el hecho de que los anticuerpos de origen calostrado pueden llegar hasta el tracto respiratorio, se ha sugerido que probablemente puedan evitar la penetración de cantidades elevadas de bacterias al pulmón, así como podrían reducir el efecto de las toxinas Apx (Nechvatalova et al., 2005).

Además, se ha observado que, si bien la presencia de niveles elevados de anticuerpos de origen materno inhibe parcialmente el desarrollo de una respuesta inmune humoral cuando los lechones son expuestos a la bacteria, tras una exposición a una dosis baja, estos animales serían los que posteriormente mejor protegidos estarían frente a un desafío (Krejci et al., 2005; Nechvatalova et al., 2005), observándose en otros estudios que cuando lechones con niveles elevados de anticuerpos calostrales se infectan y desarrollan una respuesta inmune mediada por anticuerpos, a pesar de que la seroconversión es más tardía, desarrollan una respuesta superior a los animales con niveles bajos de anticuerpos de origen materno (Sjölund et al., 2011b).

2.2.3. Interacción vacunal con la inmunidad materna

Los anticuerpos de origen materno (MDA) transferidos pasivamente a través del calostro pueden interferir con los procesos de inmunización activa que se dan en el lechón, retrasando por tanto el desarrollo de esta respuesta inmune activa que se da como respuesta a una vacuna, fenómeno que se ha observado en varias especies como humanos, vacas y cerdos, así como con varios tipos de vacunas, incluyendo tanto vacunas atenuadas como inactivadas (Salmon et al., 2009).

Incluso títulos bajos de anticuerpos maternos, en niveles no protectores, pueden continuar siendo capaces de inhibir la respuesta a la vacunación, por lo que, en esta fase de la caída de la inmunidad materna, es cuando se presenta una ventana de oportunidad para la infección por parte de los diferentes agentes patógenos (Niewiesk, 2014).

Se han sugerido varios mecanismos por los que se podría producir esta interferencia como son la neutralización de las vacunas vivas por parte de los anticuerpos maternos, enmascaramiento de los epítomos de los linfocitos B evitando su unión al antígeno vacunal e inhibiendo la activación de los linfocitos B, así como la captación de complejos antígeno-anticuerpo por parte de las células presentadoras de antígeno; siendo el

determinante principal de estos mecanismos de interferencia la ratio entre antígeno y anticuerpos maternos (Ag:MatAb) (Niewiesk, 2014; Siegrist, 2003).

Un mecanismo que se ha podido dilucidar como importante, tanto in vitro como in vivo, es la inhibición de la respuesta por los linfocitos B mediante la unión de IgG al receptor Fcγ tipo IIB (FcγRIIB). Así pues, se ha demostrado que la unión simultánea de complejos antígeno-anticuerpo tanto al receptor de linfocitos B (BCR), mediante la región variable, como al receptor FcγRIIB mediante la región constante de la IgG, produce una inhibición en la activación de los linfocitos B antígeno-específica, sugiriéndose que para que dicha unión cruzada con ambos receptores se produzca, se necesitaría un cierto tamaño mínimo del antígeno (Niewiesk, 2014).

No obstante, si bien los anticuerpos maternos son capaces de inhibir la generación de anticuerpos, también se ha observado que la respuesta por parte de los linfocitos T parece no verse afectada (Niewiesk, 2014; Siegrist, 2003).

En sentido contrario, se ha sugerido que factores maternos antígeno-específicos, que se van perdiendo a medida que el sistema inmune del lechón madura, podrían tener diferentes efectos en la respuesta inmune humoral del lechón neonato en función de la edad y el compartimento inmune, al observar en un estudio una mejor respuesta a los 7 días que a los 14 días, y de forma diferente a nivel sérico, nasal y salivar (Guzman-Bautista et al., 2014).

Esta interferencia de la inmunidad maternal de los lechones con la vacunación se ha observado con varios tipos de vacunas y frente a varios agentes como virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV), virus de la influenza porcina (swIAV), *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyoneumoniae*, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), circovirus porcino tipo 2 (PCV2), virus de la peste porcina clásica, rotavirus, *Glaesserella parasuis* y parvovirus porcino (Fiers et al., 2023; Pomorska-Mól et al., 2011; Salmon et al., 2009; Wrathall et al., 1987).

En el caso del virus de la enfermedad de Aujeszky, se ha observado por diferentes estudios una interacción entre la inmunidad maternal y las vacunas inactivadas o atenuadas (Boersma et al., 1998; Bouma et al., 1997; Pomorska-Mól et al., 2010; Van Oirschot, 1987, 1991; Van Oirschot & De Leeuw, 1985). A medida que los niveles de anticuerpos maternos frente al ADV son más elevados en el momento de la vacunación, sea por vía intranasal o parenteral, la producción de anticuerpos neutralizantes es más baja, hasta incluso llegar a estar suprimida (Pomorska-Mól et al.,

2010; Van Oirschot, 1987; Van Oirschot & De Leeuw, 1985). No obstante, también se ha observado que a pesar de no detectarse seroconversión tras la vacunación en presencia de MDA, sí que se parece inducir memoria inmunológica, sugiriéndose una contribución importante por parte de la inmunidad celular en la protección (Boersma et al., 1998; Van Oirschot, 1987, 1991), en especial en animales vacunados por vía intranasal con vacunas atenuadas, siendo esta ruta más eficiente en términos de control de la excreción vírica y de la sintomatología, sugiriéndose un importante rol por parte de la inmunidad de mucosas en la protección inferida por la vacunación (Van Oirschot, 1987, 1991), así como en animales vacunados con dos dosis de vacuna atenuada a las 10 y 14 semanas de vida, una vez que el nivel de anticuerpos maternos no es tan elevado como para interferir en la eficacia vacunal (Pomorska-Mól et al., 2010).

En el caso de vacunas frente al circovirus porcino tipo 2 (PCV2), se ha observado por diversos estudios que se produce una interferencia de los anticuerpos de origen materno con el desarrollo de una respuesta inmune humoral tras la vacunación, evidenciada por una ausencia o reducción de la seroconversión (Feng et al., 2016; Fort et al., 2009; Fraile et al., 2012; Kiss et al., 2021; Martelli et al., 2016; Poulsen Nautrup et al., 2021), siendo esta interferencia más elevada a medida que el nivel de anticuerpos maternos es más elevado (Feng et al., 2016; Fort et al., 2009; Fraile et al., 2012; Kiss et al., 2021; Martelli et al., 2016). Sin embargo, a pesar de la presencia de inmunidad humoral de origen materno, la vacunación es efectiva en términos de reducción de la viremia y excreción de virus, así como en términos de sintomatología clínica (se reduce la mortalidad y se mejora la ganancia media diaria), posiblemente debido a la inducción de una respuesta inmune de tipo celular en respuesta a la vacunación (Feng et al., 2016; Figueras-Gourgues et al., 2019; Fort et al., 2009; Fraile et al., 2012; Haake et al., 2014; Kiss et al., 2021; Martelli et al., 2016; Opriessnig et al., 2008; Poulsen Nautrup et al., 2021; Villa-Mancera et al., 2016). No obstante, se ha sugerido que animales vacunados con niveles bajos de anticuerpos maternos pueden presentar beneficios en términos de control de la viremia y ganancia media diaria en comparación con animales vacunados en presencia de niveles extremadamente elevados de inmunidad materno (Feng et al., 2016), si bien otros estudios sugieren lo opuesto, que el grado de protección no está relacionado con el nivel de anticuerpos maternos en el momento de la vacunación, cuando ésta se lleva a cabo a partir de las 3-4 semanas de vida (Figueras-Gourgues et al., 2019; Martelli et al., 2016; Martin-Valls et al., 2023). También se ha sugerido, que los anticuerpos de origen materno no son el único factor que podría

interferir con la vacunación frente a PCV2, sino que otros factores, como citoquinas inespecíficas o factores asociados a la inmunidad celular específica, podrían jugar un importante rol, ya que animales vacunados en la primera semana de vida, a pesar de tener niveles de anticuerpos maternos equivalentes a animales vacunados a las 3 semanas de edad, la vacunación se mostró inefectiva (Haake et al., 2014).

En el caso del virus de la influenza porcina (swIAV), también se ha observado que tras la administración de vacunas inactivadas en presencia de niveles elevados de anticuerpos maternos específicos, no se induce una producción significativa de anticuerpos (Kitikoon et al., 2006; Markowska-Daniel et al., 2011; Rajao et al., 2016), sugiriéndose una correlación negativa entre los títulos de inhibición de la hemaglutinación (IH) al momento de la vacunación y el desarrollo de una respuesta inmune humoral post-vacunal (Markowska-Daniel et al., 2011), observándose además que la presencia de anticuerpos maternos en el momento de la vacunación puede reducir la eficacia de la vacuna en términos de síntomas clínicos y lesiones (Kitikoon2006, Sandbulte2014), nivel de replicación vírica (Sandbulte et al., 2014), así como inhibición de la producción de linfocitos T de memoria específicos frente a swIAV (Kitikoon et al., 2006). Sin embargo, se ha observado que la aplicación de una vacuna viva atenuada por vía intranasal o intramuscular en presencia de anticuerpos maternos puede conferir protección frente al swIAV en términos de reducción de síntomas clínicos, lesiones y replicación vírica a nivel de vías aéreas, si bien la administración de la vacuna viva por vía intramuscular en presencia de MDA no desencadenó una respuesta mediada por anticuerpos (Pyo et al., 2015; Sandbulte et al., 2014).

Resultados contradictorios se han observado en cuanto a la interacción de los anticuerpos de origen materno con las vacunas vivas atenuadas (MLV) aplicadas frente al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS). Así, algunos estudios han observado una clara interferencia de los MDA con la vacunación mediante MLV, con una reducción de la respuesta inmune de tipo humoral y celular, así como en términos de parámetros virológicos, sugiriendo además que otros factores como el interferón de tipo α podría interferir también con la vacunación, hipotetizando una posible inhibición en la replicación del virus vivo vacunal por parte de esta citoquina (Fablet et al., 2016; Fiers et al., 2023, 2024; Renson et al., 2019). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que la inmunidad materno en animales vacunados con 1 día de vida mediante una vacuna MLV no interfería con el desarrollo de una respuesta inmune parcialmente protectora frente al desafío con el virus, determinado mediante una

mejora en los parámetros clínicos, productivos y virológicos, así como en el desarrollo de una respuesta inmune mediada por anticuerpos determinada mediante seroconversión (Balasch et al., 2018; Jeong et al., 2018).

La vacunación con vacunas inactivadas frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* en presencia de anticuerpos maternos también se ha observado que interfiere con el desarrollo de la respuesta inmune de tipo humoral, con una baja o nula seroconversión de los lechones vacunados en presencia de MDA, si bien parece que esta interferencia no afecta a la respuesta inmune de tipo celular, por lo que se ha sugerido que esta ausencia de seroconversión no afecta a la efectividad de la vacuna en términos de protección clínica (Bandrick et al., 2014b; Martelli et al., 2006).

En cuanto a la interferencia de la inmunidad maternal con vacunas frente a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en un estudio de campo se observó que la vacunación con una vacuna de subunidades a base las toxinas ApxI-III y una Omp en presencia de niveles elevados de anticuerpos maternos no desencadenó respuesta serológica detectable, sugiriéndose que la interferencia de la inmunidad maternal con la vacunación pudo afectar a la eficacia de la vacuna (Jirawattanapong et al., 2008), mientras que en otro estudio la vacunación de animales en presencia de niveles bajos o inexistentes de inmunidad maternal frente a las toxinas I y III sí que indujo una respuesta serológica detectable, no detectándose seroconversión frente a la toxina ApxII, posiblemente debido a niveles más elevados de anticuerpos maternos en los lechones frente a esta toxina, si bien se sugiere que este hecho no afectó a la eficacia vacunal (Tumamao et al., 2004a).

Se han estudiado para varias enfermedades diferentes estrategias para eludir la interferencia de la inmunidad maternal con la vacunación, como vacunas de ADN, vacunación a través de mucosas, vacunas vectorizadas recombinantes, así como combinaciones de vacunas con citoquinas o diferentes adyuvantes, todas ellas con resultados contradictorios (Niewiesk, 2014; Salmon et al., 2009; Siegrist, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos primarios

El primer objetivo de este trabajo fue realizar una valoración de los niveles y la duración de los anticuerpos maternos frente a las toxinas Apx I, II, III y IV y frente a una proteína de la membrana externa (OmpA) de *A. pleuropneumoniae*, desde el nacimiento hasta la 10ª semana de vida, así como su relación con los niveles de anticuerpos presentes en sus progenitoras frente a dichas toxinas.

En segundo lugar, realizar un estudio de la correlación entre los niveles de anticuerpos frente a las toxinas Apx y frente a la proteína OmpA, medidos con tres pruebas ELISA *in house* para la detección de anticuerpos maternos frente a las toxinas ApxI-III, con un kit diagnóstico comercial para detección de anticuerpos frente a la toxina ApxIV de *A. pleuropneumoniae* y otro kit para la detección de anticuerpos frente a la proteína de la membrana externa (OmpA) de la bacteria.

3.2. Objetivos secundarios

Uno de los objetivos secundarios de este trabajo fue el estudio de un protocolo para evitar que los lechones procedentes de cerdas positivas a *A. pleuropneumoniae* fuesen colonizados por la bacteria durante la duración del estudio.

Otro de los objetivos secundarios de este estudio fue realizar una evaluación mediante las cuatro pruebas ELISA ApxI-IV de la detección de anticuerpos frente a las toxinas ApxI, II, III y IV en una granja negativa a *A. pleuropneumoniae*, así como evaluar la detección de anticuerpos frente a la OmpA en dicha granja negativa, mediante el kit ELISA para OmpA de APP, y evaluar la concordancia entre las diferentes pruebas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Selección de las granjas

Para llevar a cabo el presente trabajo se seleccionaron dos estructuras productivas diferentes, una de ellas positiva a *A. pleuropneumoniae* (estructura A), en la que poder evaluar la dinámica de los anticuerpos maternos frente a las toxinas Apxl-III y IV y frente a la proteína OmpA en condiciones de campo; y la otra negativa a *A. pleuropneumoniae* (estructura B), en la que poder evaluar la presencia, si es que la hubiere, mediante las pruebas serológicas utilizadas en el estudio, de anticuerpos frente a las toxinas Apxl-III y IV y frente a la proteína OmpA de *A. pleuropneumoniae* en animales procedentes de una granja negativa a la enfermedad.

La estructura A consistió en un sistema de producción multi sitio en 3 fases perteneciente a una compañía integradora de ganado porcino sita en la Región de Murcia (España). En concreto, estaba compuesta por:

- Granja A. Granja de 2.000 reproductoras, genética cruzada Landrace y Large White con producción de lechón a destete (28 días de vida) situada en el municipio de Murcia (España) con un sistema productivo en bandas semanales mediante flujo todo dentro – todo fuera. Programa sanitario con vacunación de cerdas frente a Parvovirus porcino y *Erysipelothrix rhusiopathiae* en la segunda semana de lactación, Enfermedad de Aujeszky cada 4 meses en sábana, Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino cada 4 meses en sábana, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* a los 90 días de gestación, así como lechones frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* y Circovirus Porcino tipo 2 a los 21 días de vida.
- Transición A. Granja de transición dividida en 5 naves con capacidad para 550 lechones cada una, alojando a los lechones desde el destete (≈ 6 kg de peso vivo) a la entrada a cebo (≈ 20 kg peso vivo), entre la 4ª y 10ª semanas de vida, situada en el municipio de Fuente Álamo, Murcia (España), con manejo todo dentro todo fuera por nave con un único origen de lechones.
- Cebo A. Granja de cebo con 3 naves y capacidad de 550 animales cada una de ellas, alojando a los animales desde los ≈ 20 kg de peso vivo hasta salida a matadero, con un peso aproximado de 120 kg, entre la 10ª y 24ª semanas de vida, situada en el municipio de Librilla, Murcia (España), con un único origen de

lechones. En este emplazamiento, los animales se vacunan frente a Enfermedad de Aujeszky a la 12ª y 14ª semana de vida.

Esta estructura, positiva a *A. pleuropneumoniae*, presentaba brotes clínicos frente a la enfermedad en animales en fase de cebo, de los que se tomaron muestras de pulmón para realizar cultivo y determinación del serotipo implicado en los brotes clínicos, así como el antibiograma correspondiente. Posteriormente se llevó a cabo el chequeo serológico de 30 cerdas seleccionadas aleatoriamente para confirmar la positividad de la granja mediante kit serológico IDEXX APP-ApxIV Ab (Idexx, Westbrook, Estados Unidos). Todos los análisis con este kit fueron llevados a cabo en un laboratorio externo, Ovislab SL (Llinars del Vallés, Barcelona, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez seleccionadas las cerdas participantes en el estudio, siguiendo los criterios que se explican en el siguiente apartado, a todas ellas se les realizó un chequeo serológico para confirmar la positividad mediante kit serológico IDEXX APP-ApxIV Ab, así como un chequeo serológico específico de serotipos de *A. pleuropneumoniae* para confirmar los serotipos frente a los que había anticuerpos en las cerdas mediante kit serológico Swinecheck® mix-APP 1-2-9-11, 3-6-8-15, 4-5-7, Swinecheck® mix-APP 10-12 y Swinecheck® APP 13 (Biovet, Saint-Hyacinthe, Canadá) siguiendo en ambos casos las instrucciones de los fabricantes por parte del laboratorio externo Ovislab SL.

La estructura B consistió en una granja de multiplicación perteneciente a una compañía integradora de ganado porcino sita en Cataluña (España), con 900 reproductoras, raza Landrace, destinadas a la producción de futuras cerdas F1 (cruce Landrace por Large White), destete a 28 días de vida, localizada en el municipio de La Muela, Zaragoza (España), sistema productivo en bandas semanales y flujo todo dentro – todo fuera. Programa sanitario con vacunación de cerdas frente a Parvovirus porcino y *Erysipelothrix rhusiopathiae* en la segunda semana de lactación, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* a los 90 días de gestación, así como vacunación de lechones frente a Circovirus Porcino tipo 2 a los 21 días de vida, siendo esta granja negativa a *Mycoplasma hyopneumoniae*. Las lechonas una vez destetadas, son alojadas en la misma granja en las instalaciones de transición hasta las 10 semanas de vida (≈18 kg), momento en el que son enviadas a los centros de recría. Los lechones (machos), una vez destetados, son enviados a matadero.

De esta estructura, negativa a *A. pleuropneumoniae*, se toman muestras para confirmación de negatividad, a través de un chequeo serológico de 30 cerdas mediante kit serológico IDEXX APP-ApxIV Ab (Idexx, Westbrook, Estados Unidos).

Ambas estructuras productivas cumplían con los requerimientos del Real Decreto 1135/2002, de 31 de octubre, relativo a las normas mínimas para la protección de cerdos, así como con los del Real Decreto 306/2020, de 11 de febrero, por el que se establecen las normas básicas de ordenación de las granjas porcinas intensivas en España.

4.2. Selección de los animales

Con el objetivo de tener un tamaño muestral mínimo de 30 animales, y así tener una muestra lo suficientemente grande de modo que, por el teorema central de límite la distribución de la media de las variables estudiadas se aproximase a una ley Normal, y como tales pudiesen ser analizadas estadísticamente por técnicas paramétricas (método asintótico), se determinó la selección de 42 lechones en cada grupo, con una previsión a máximos de posibles pérdidas del 40% durante la duración del estudio (20% durante la fase de lactación, 10% durante la fase de transición y 10% durante la fase de cebo).

Así pues, en la granja de reproductoras de la estructura A, para formar el grupo A, se seleccionaron aleatoriamente, estratificando por paridad, 7 cerdas de un lote semanal de partos al momento de entrada a las salas de lactación, y de cada una de estas 7 cerdas, a las 24 horas del parto se seleccionaron de forma aleatoria, estratificando por sexo, 6 lechones, siendo por tanto un total de 42 lechones, que se identificaron mediante crotal auricular de botón con punta de acero Inserfix® (Inserbo S.L., Lleida, España), de color verde y numerados del 1 al 42, colocados en ambos pabellones auriculares. En cuanto al sexo, el grupo quedó conformado por 22 machos y 20 hembras.

Los 42 animales fueron alojados en las condiciones de producción de la estructura A, situados todos en las mismas salas de transición y cebo, y conviviendo dentro de las mismas instalaciones con otros animales procedentes del mismo lote productivo que no estaban incluidos en la prueba, y por tanto no fueron sometidos a ninguno de los tratamientos utilizados en el estudio.

En la estructura B, para la formación del grupo B, se seleccionaron aleatoriamente 42 lechones en el momento del destete y entrada a sala de transición, y se identificaron mediante crotal auricular de botón con punta de acero Inserfix® (Inserbo S.L., Lleida, España) de color blanco, quedando numerados del 1 al 42 con crotal de color blanco, colocados en ambos pabellones auriculares. En este caso, al tratarse de una granja de multiplicación, para facilitar el seguimiento de los animales, todos los lechones seleccionados fueron hembras.

Todos estos animales fueron alojados en las condiciones de producción de la estructura B, situados en las mismas salas de transición, y conviviendo en las mismas instalaciones con otros animales procedentes del mismo lote productivo que no estaban incluidos en la prueba.

4.3. Manejo de los animales

En la granja A, positiva a *A. pleuropneumoniae*, con el objetivo de evitar que los lechones fuesen colonizados por la bacteria que se pudiese transmitir por parte de la madre, y que los anticuerpos detectados se debiesen exclusivamente a los transmitidos por su madre a través del calostro, en función de la bibliografía existente y de los resultados obtenidos en el antibiograma, se llevó a cabo un protocolo consistente en el tratamiento de todas las cerdas reproductoras del lote semanal con marbofloxacina (Marbox[®], Ceva Santé Animale, Francia) a 8 mg/kg el día del parto, así como a los 11 días de lactación, llevado a cabo mediante jeringa Starvet[®] de 20 ml graduable (Inserbo S.L., Lleida, España), con agujas reforzadas Starvet[®] (Inserbo S.L., Lleida, España), con un tamaño de 50 x 20 mm, con el objetivo de evitar la excreción de *A. pleuropneumoniae* por parte de las cerdas.

También en la estructura A, y vistos los resultados del antibiograma, los lechones incluidos en la prueba fueron tratados con una dosis de tulatromicina (Tulaven[®], Ceva Santé Animale, Francia) a 5 mg/kg cada 14 días desde la segunda semana hasta la decimosexta semana de edad, mediante un dispositivo de vacunación HSW Eco-Matic[®] de 0,2-2 ml (Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Alemania), con agujas reforzadas Starvet[®] (Inserbo S.L., Lleida, España), con tamaño en función de la edad (ver tabla), con el objetivo de evitar la infección por la bacteria procedente de la madre durante la fase de lactación o procedente de los otros animales del lote durante las fases de transición y cebo.

Tabla 3. Tamaño de aguja utilizado según la edad

Edad (semanas)	Tamaño de aguja (mm.)
2	15 x 15
4	20 x 15
5	25 x 15
6	25 x 15
7	25 x 15
8	30 x 15
9	30 x 15
10	30 x 15
12	35 x 15
14	35 x 15
16	35 x 15

Ninguno de estos tratamientos preventivos en cerdas y lechones fue aplicado en la estructura B.

En ambas granjas los lechones fueron destetados a los 28 días de edad y trasladados a las instalaciones descritas de transición, en las que estuvieron hasta la semana 10 de edad. En el caso de la estructura A posteriormente fueron trasladados a las instalaciones de engorde descritas, donde permanecieron al menos hasta el final del estudio, a las 18 semanas de edad. En el caso de la estructura B, el seguimiento finalizó a las 10 semanas de vida.

Todos los procedimientos aplicados en estos estudios fueron evaluados por el comité de bioética de la Universidad de Murcia (CEEA871) y autorizados por la Consejería de Agricultura, Ganadería, Medio Ambiente y Agua de la Región de Murcia (A13231104).

4.4. Toma de muestras

La toma de muestras de sangre de las cerdas se realizó mediante venopunción cervical con sistema Vacutainer® y agujas de 38 x 1,2 mm en tubos sin aditivos (Becton Dickinson & Company, New Jersey, Estados Unidos).

La toma de muestras de sangre de los lechones se realizó mediante venopunción cervical con sistema Vacutainer® y agujas de 25 x 0,9 mm en tubos sin aditivos (Becton Dickinson & Company, New Jersey, Estados Unidos) hasta la sexta semana de vida, de la séptima semana en adelante las agujas utilizadas fueron de 25 x 1,2 mm, también con sistema Vacutainer®.

Los animales del grupo A fueron muestreados a las 24 horas de vida, para determinar el nivel de anticuerpos de origen maternal frente a las toxinas Apxl-III y IV y frente a la proteína

OmpA, obtenidos tras el encalostrado, y posteriormente fueron muestreados cada 7 días hasta la semana 10 de vida para evaluar la presencia, niveles y la evolución de dichos anticuerpos, finalmente se realizó un último muestreo a la semana 18 de vida para chequear el nivel de anticuerpos frente a la toxina ApxIV con el objetivo de testar si los animales se habían infectado por *A. pleuropneumoniae*, y comparar los resultados con el resto de pruebas serológicas. En este grupo también se tomaron muestras de las cerdas seleccionadas para comparar los niveles de anticuerpos de los lechones a las 24 horas con los de sus progenitoras.

Los animales del grupo B fueron muestreados a las 4 y 10 semanas de vida, en los momentos del destete y de salida a centros de recría, como controles negativos de la prueba serológica frente a las toxinas ApxI-III y IV y la proteína OmpA, y para evaluar la posible presencia de anticuerpos debido a otros patógenos presentes en la granja con producción de toxinas ApxI-III, otras toxinas RTX o presencia de proteínas de membrana que pudiesen presentar reacción serológica cruzada.

Tabla 4. Resumen de los grupos A y B

	Grupo A	Grupo B
Crotal	Verde	Blanco
Lechones	22 machos	42 hembras
	20 hembras	
Estatus APP	Positivo	Negativo
Nº de muestreos	11 (semanales)	2
Primer muestreo	24 horas	Semana 4
Ultimo muestreo	Semana 10	Semana 10
	*Muestreo adicional a semana 18	
Tratamiento preventivo APP	Si	No

4.5. Evaluación clínica

Los animales del grupo A fueron valorados clínicamente una vez por semana, desde las 24 horas de vida hasta la semana 18, realizando una evaluación de síntomas respiratorios: tos

y disnea. Esta evaluación se realizó mediante el sistema propuesto por Roberts et al., (2011), con la siguiente metodología:

- Tos. (0-3)
 - 0= No presenta tos
 - 1= Tos leve, episodios aislados, de corta duración (inferior a 5 segundos), sin descarga nasal
 - 2= Tos moderada, episodios aislados, duración > a 5 segundos y con descarga nasal, sin dificultad respiratoria.
 - 3= Episodios de tos insidiosa y recurrente, que producen dificultad respiratoria.
- Disnea. (0-3)
 - 0= No presenta disnea
 - 1= Ligera respiración abdominal, sin dificultad para el movimiento.
 - 2= Respiración abdominal, animales con dificultad moderada para el movimiento, se mueven si se les levanta, permanecen tumbados lateralmente.
 - 3= Dificultad respiratoria severa, postura de perro sentado.

4.6. Procesado de las muestras

Todas las muestras obtenidas se mantuvieron en refrigeración durante todo el proceso de extracción y transporte a laboratorio mediante cajas isotermas y acumuladores de frío. Una vez en el laboratorio situado en la Facultad de Veterinaria de Murcia, se separó el suero mediante centrifugación durante 10 minutos a 3.000 rpm, en una centrifugadora Centronic S-577 (J.P. Selecta, Barcelona, España) y éste fue almacenado en microtubos graduados de polipropileno Eppendorf® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Estados Unidos) en cámara de congelación a -80°C en un congelador Platinum 340 (Angelantoni Life Sciences Srl., Massa Martana, Italia) hasta el momento de realizar los análisis.

4.7. Pruebas ELISA Apx I, II y III

Estas tres pruebas serológicas para la detección de anticuerpos frente a las toxinas ApxI, II y III mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) se llevaron a cabo siguiendo la metodología

desarrollada en el laboratorio internacional de referencia para la pleuroneumonía porcina causada por *A. pleuropneumoniae* en la Universidad de Montreal (Canadá), bajo la supervisión del Dr. Marcelo Gottschalk.

4.7.1. Preparación de la solución de antigenado

Para la preparación de la solución empleada en el antigenado de placas se añade a un matraz de 1 litro de capacidad 5,2 gramos de NaHCO_3 (Scharlab S.L., Barcelona, España), 4,0 gramos de Na_2CO_3 (Scharlab S.L., Barcelona, España), medido mediante báscula de precisión TE1502S (Sartorius AG, Gottingen, Alemania) y se completa hasta 1.000 mililitros con agua desmineralizada, agitando hasta su completa disolución, mientras se mide con pH-metro modelo Crison Digit-501 (Crison Instruments S.L., Barcelona, España) hasta que el pH quede estabilizado en 9,6. Esta solución se mantiene en refrigeración a 4°C en refrigerador Liebherr mod. 2834 Comfort (Liebherr International Deutschland GmbH, Alemania), con una duración máxima de 1 semana.

4.7.2. Preparación de la solución de lavado

La preparación de la solución de lavado empleada durante la prueba se realiza preparando dos soluciones diferentes:

- Solución A, compuesta por 17,52 gr de NaCl (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Países Bajos), 2,76 gr de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Scharlab S.L., Barcelona, España), 1 l de agua desmineralizada y se agita hasta su completa disolución.
- Solución B, compuesta por 61,32 gr de NaCl, 9,94 gr de Na_2HPO_4 (Scharlab S.L., Barcelona, España), 3,5 litros de agua desmineralizada y se agita hasta su completa disolución.

Una vez tenemos ambas soluciones, se mide con pH-metro el pH de la solución B, mientras se añade solución A hasta que el pH alcance 7,3 (7,25-7,35).

Se evalúa el volumen total de la solución final en litros y se añaden por cada litro 0,5 ml de Tween-20 (Biorbyt Ltd., Cambridge, Reino Unido). Esta solución final se agita durante al menos 15 minutos.

4.7.3. Rehidratación de las proteínas Apx

Se añaden mediante pipeta monocanal automática Handrop® (Deltalab S.L., Barcelona, España) 500 µl de agua desmineralizada a un vial de 500 µg de proteína Apx I, II o III recombinante liofilizada (Bio Basic Inc., Markham, Canadá), mezclándose hasta su

completa disolución, realizándose alícuotas de 30 μ l, que se almacenan a -80°C en tubos eppendorf® para su posterior uso durante el antigenado de las siguientes placas.

4.7.4. Tapizado de placas serológicas

Para el antigenado de las placas se añaden 12 μ l de la solución 1 mg/ml de la proteína Apx I, II o III preparada en el punto anterior en un tubo de ensayo y se añaden 6 ml de la solución de antigenado mediante aspirador de pipetas de seguridad (Deltalab, Barcelona, España) y pipeta monouso de cristal (Deltalab, Barcelona, España), se agita en Vortex ZX3 (Velp Scientifica Srl., Italia) y posteriormente se distribuye mediante pipeta multicanal automática de 8 canales Finnpipette® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) a 50 μ l/pocillo en cada columna de la 2 a la 12 de una placa serológica de poliestireno con 96 pocillos Costar® (Corning Inc., Kennebunk, USA), quedando la columna 1 como control negativo. Finalmente se cubre la placa con un adhesivo plástico de poliéster (Corning Inc., Kennebunk, USA) y se incuba a 4°C durante 18 horas en un refrigerador Liebherr mod. 2834 Comfort (Liebherr International Deutschland GmbH, Alemania).

4.7.5. Preparación de las muestras y controles

Cada placa incluye dos controles positivos y dos controles negativos, testándose cada muestra también por duplicado, distribuidas tal y como se indica en la imagen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○
B	●	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○
C	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	●	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○
F	●	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○
G	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 1. Organización de las placas para ELISA (cortesía Sonia Lacouture, Universidad de Montreal). En color negro: sin antigenar; en azul: control positivo; en verde: control negativo; y resto: muestras a evaluar por duplicado.

- **Dilución 1/50.** Para cada suero, control positivo y control negativo se dispensan 245 µl de solución de lavado en un tubo de dilución, se agita el suero, previamente atemperado a temperatura ambiente, y se añaden 5 µl de este.
- **Diluciones 1/1600 (para Apx I y III).** Para cada suero, control positivo y control negativo se dispensan 310 µl de solución de lavado en un tubo de dilución, y se añaden 10 µl de la solución 1/50.
- **Dilución 1/3200 (para Apx II).** Para cada suero, control positivo y control negativo se dispensan 630 µl de solución de lavado en un tubo de dilución, y se añaden 10 µl de la solución 1/50.

4.7.6. Desarrollo de la prueba

Se retira el adhesivo, se lava con solución de lavado 3 veces la placa antigenada y posteriormente se sacude con movimientos firmes y secos para retirar el líquido remanente hasta que la placa quede seca.

Se añaden 50 µl de la muestra diluida (1/1600 o 1/3200 según sea Apx I, II o III) y de los controles positivo y negativo a los pocillos, acorde al esquema indicado y se deja incubar durante 1 hora a 37°C en una estufa Binder modelo ED 23 (Binder GmbH, Tuttlingen, Alemania), de este modo los anticuerpos específicos frente a la toxinas ApxI, II o III presentes en la muestra, según el caso, se unen al antígeno que tapiza los pocillos formando un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo.

Unos minutos antes del final del periodo de incubación se prepara la solución de conjugado (una inmunoglobulina específica para porcino unida al enzima peroxidasa) añadiendo 3 µl de Peroxidasa AffiniPure Goat Anti-Swine IgG, (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, USA) a 18 ml de solución de lavado en un tubo cónico de 50 ml (Deltalab, Barcelona, España).

Tras la incubación de las muestras diluidas, se vuelve a lavar la placa 3 veces con solución de lavado, se añaden 50 µl de solución de conjugado a cada pocillo mediante pipeta multicanal automática (excepto a la columna 1), y se vuelve a incubar durante 1 hora en estufa a 37°C, en este paso, la inmunoglobulina específica para porcino unida al enzima

peroxidasa, se une a los anticuerpos que se unieron a la proteína ApxI, II o III, según el caso, con que se tapizaron la placa.

Posteriormente a la incubación, mediante pipeta multicanal automática, se añaden a cada pocillo 100 μ l de solución de cromógeno TMB, (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA), previamente atemperada en oscuridad, y se incuba durante 15 minutos en estufa a 37°C.

Finalmente se añaden, mediante pipeta multicanal automática, 50 μ l de H₂SO₄ 1N a cada pocillo para detener la reacción de la solución de cromógeno, y se procede a su lectura mediante un lector de microplacas Anthos 2010, (Anthos Labtec Instruments, Austria) a 450 nm. El grado de color que se haya generado será directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos frente a los antígenos ApxI, II o III (según el caso) presentes en la muestra

4.7.7. Validación de la prueba

La prueba es considerada válida si la densidad óptica (DO) a 450 nm del control negativo es inferior a 0,3 y el control positivo es superior o igual a 0,9 e inferior a 1,5. También se evalúa la concordancia entre muestras duplicadas en la misma placa, no aceptándose una variación entre ellas superior al 30%.

4.7.8. Cálculo de resultados

Para la obtención del resultado final, en primer lugar, se realiza la media de la DO de los dos pocillos que contienen la misma muestra, de los dos controles positivos, así como de los dos controles negativos, obteniendo así la DO final de la muestra (S), la DO final del control positivo (CP), y la DO final del control negativo (CN).

El resultado final de cada muestra (en valor S/P) será el cociente entre los valores S de cada muestra y los valores CP de la placa, restando a ambos el valor del CN de la placa, tal y como se expone en la siguiente fórmula:

$$\text{valor } S/P = \frac{S - CN}{CP - CN}$$

En este estudio el resultado se ha considerado positivo cuando el valor S/P supera el valor de 0,3. En todas las figuras que expresan resultados, este punto de corte se ha marcado con una línea roja.

4.8. Prueba ELISA ApxIV

La prueba serológica para la detección de anticuerpos frente a la toxina ApxIV mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) se llevó a cabo en el laboratorio de diagnóstico Ovislab SL (Llinars del Vallés, Barcelona (España), mediante el kit de diagnóstico comercial IDEXX APP-ApxIV Ab (Idexx, Westbrook, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. En este kit las placas se suministran tapizadas con una la toxina ApxIV recombinante, las muestras diluidas se incuban en dichas placas y los anticuerpos específicos frente a la toxina ApxIV se unen al antígeno que tapiza los pocillos formando un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo, eliminándose mediante lavado el material que no haya quedado unido. Posteriormente, se añade un conjugado formado por una inmunoglobulina específica para porcino unida a una enzima peroxidasa, el cual tiene la capacidad de unirse a los anticuerpos que se unieron a la proteína ApxIV que tapiza la placa. El conjugado que no se ha unido se elimina mediante lavado y finalmente se añade solución de cromógeno TMB a los pocillos. El grado de color que se genera (medido a una densidad óptica de 450 nm) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos frente a la proteína ApxIV presente en la muestra. Los resultados se obtienen comparando la densidad óptica de los pocillos con muestra (S), con la densidad óptica de los pocillos que contienen el control positivo (CP), restando a ambos el valor del control negativo (CN), expresado en valor S/P, mediante la fórmula:

$$\text{valor } S/P = \frac{S - CN}{CP - CN}$$

El fabricante considera un resultado positivo cuando el valor S/P es superior a 0,5. En todas las figuras que expresan resultados, este punto de corte se ha marcado con una línea roja.

4.9. Prueba ELISA OmpA

La prueba serológica para la detección de anticuerpos frente a la proteína de la membrana externa A de *A. pleuropneumoniae* (OmpA) mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) se llevó a cabo en el laboratorio de diagnóstico Seysa, en Valmojado, Toledo (España),

mediante el kit de diagnóstico comercial APP OmpA Antibody Test (Biochek BV., Reeuwijk, Países Bajos), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. En este kit las placas se suministran tapizadas con la proteína de la membrana externa A (OmpA) de *A. pleuropneumoniae*, las muestras diluidas se incuban en dichas placas y los anticuerpos específicos frente a la proteína OmpA se unen al antígeno que tapiza los pocillos formando un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo, eliminándose mediante lavado el material que no haya quedado unido. Posteriormente, se añade un conjugado formado por una inmunoglobulina específica para porcino unida a una enzima fosfatasa alcalina, el cual tiene la capacidad de unirse a los anticuerpos que se unieron a la proteína OmpA que tapiza la placa. El conjugado no unido se elimina mediante lavado y finalmente se añade la solución de cromógeno a base de fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) a los pocillos. El grado de color que se genera (medido a una densidad óptica de 405 nm) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos frente a la proteína OmpA presente en la muestra. Los resultados se obtienen comparando la densidad óptica de los pocillos con muestra (S), con la densidad óptica de los pocillos que contienen el control positivo (CP), restando a ambos el valor del control negativo (CN), expresado en valor S/P, con la fórmula:

$$\text{valor } S/P = \frac{S - CN}{CP - CN}$$

El fabricante considera un resultado positivo cuando el valor S/P supera el valor de 0,5. En todas las figuras que expresan resultados, este punto de corte se ha marcado con una línea roja.

4.10. Análisis estadístico

Tal y como se ha especificado anteriormente, el tamaño muestral se estableció de tal modo que, por el teorema central de límite, la distribución de la media de las variables estudiadas se aproximase a una ley Normal, y como tales pudiesen ser analizadas estadísticamente por técnicas paramétricas (método asintótico). No obstante, previamente a la aplicación de métodos paramétricos para la comparación de variables cuantitativas se ha comparado la normalidad de los datos de la variable mediante el método de Shapiro-Wilk, así como la homogeneidad de varianzas mediante el método de Levene, especialmente en aquellos casos de comparaciones entre valores de cerdas o camadas, en los que el tamaño muestral es más reducido.

Aun así, la mayor parte del análisis estadístico de los datos se realizó a través de pruebas de relación monótona entre variables cuantitativas basadas en el coeficiente de correlación de Spearman (r_s), con el cálculo de su grado de significación e intervalo de confianza; así como mediante modelos de regresión lineal simple o múltiple, con el cálculo de los coeficientes de regresión, su grado de significación e intervalo de confianza al 95%, así como el cálculo del coeficiente de determinación (R^2) del modelo, ajustando por las posibles variables de influencia o confusión en el caso necesario.

En caso de que ofreciesen un mejor ajuste a los datos obtenidos, también se utilizaron modelos de regresión polinómicos fraccionales multivariantes.

En ambos grupos, en todos los puntos de muestreo y con todas las pruebas serológicas estudiadas se realizó un análisis descriptivo con los principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones: media, desviación estándar, valores mínimos y máximo, mediana y frecuencia de valores positivos, con el cálculo del intervalo de confianza al 95% de la media.

El nivel de anticuerpos en las cerdas frente a las toxinas Ap α 1-IV y frente a la OmpA, medidos con las diferentes pruebas serológicas evaluadas se comparó mediante análisis de la varianza (ANOVA) con test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

La asociación lineal del nivel de anticuerpos maternos en lechones con la edad de estos, se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman con su intervalo de confianza al 95% y su grado de significación, así como mediante un modelo de regresión lineal simple con intervalo de confianza y grado de significación del coeficiente de regresión.

La asociación entre el sexo de los lechones y los niveles de inmunidad maternal a las 24 horas de vida se evaluó mediante regresión lineal simple con intervalo de confianza y grado de significación del coeficiente de regresión.

La asociación entre el nivel de anticuerpos en las madres y el nivel de anticuerpos maternos a las 24 horas en los lechones se estudió mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman con su intervalo de confianza al 95% y su grado de significación, así como mediante un modelo de regresión lineal simple con intervalo de confianza y grado de significación del coeficiente de regresión.

Para el análisis del grado de relación entre los niveles de anticuerpos en las cerdas y el valor de anticuerpos maternos en los lechones a lo largo de las diferentes edades de muestreo, se utilizó un modelo de regresión múltiple ajustado por nivel de anticuerpos de las cerdas y

edad de los lechones, con los intervalos de confianza y grados de significación de los coeficientes de regresión, y con los coeficientes Beta estandarizados para estudiar que variable ejerce una mayor influencia. En el caso de los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxI, ApxIII y frente a la OmpA, se ha utilizado también un modelo de regresión polinómica fraccional multivariable ya que ofrecía un mejor ajuste a los datos obtenidos que la regresión lineal.

El estudio comparativo de los valores S/P a las 24 horas entre las diferentes camadas, en vista del pequeño tamaño de muestra (7 camadas), se comprobó si se vulneraban las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante test de Shapiro-Wilk y prueba de Levene, y tras confirmar la vulneración de ambas condiciones, se realizó la comparación mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, que no obstante ofreció unos resultados muy similares a los obtenidos mediante la comparación utilizando el método de Análisis de la Varianza (ANOVA), con prueba post-hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples.

El análisis de la asociación entre la paridad de las cerdas y los valores S/P de los lechones se llevó a cabo mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman con su intervalo de confianza al 95% y su grado de significación. Para analizar las diferencias entre cerdas de mayor o menor paridad, se separaron las cerdas en dos grupos (un grupo con las cerdas de paridad 1 y 2, y otro cluster con las cerdas con más de 2 partos), para establecer si había diferencias significativas entre cerdas según el tiempo que hubiesen permanecido en la granja, evaluando la diferencia entre las medias con la prueba W de Wilcoxon.

El análisis de la diferencia en la media del valor S/P entre los grupos A y B a las mismas edades se ha realizado mediante la técnica t de Student y la diferencia en la frecuencia de positivos a las mismas edades mediante Chi cuadrado.

El estudio de concordancia entre las diferentes pruebas serológicas evaluadas se ha realizado mediante el cálculo del índice *kappa*, el índice *kappa* ajustado por sesgo y prevalencia (índice PABAK) interpretado mediante la escala de Altman, y los índices de acuerdo específicos positivo y negativo.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el software estadístico Stata/IC versión 16.1 (StataCorp LLC, Texas, USA), y la significación estadística se estableció en un valor $p < 0,05$. También se han calculado en todos los casos los intervalos de confianza al 95% de las medias, diferencias entre medias o frecuencias, coeficientes de correlación y

de regresión, para una mejor valoración del grado de significación biológica del grado de asociación entre las variables en caso de que la hubiese.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Resultados serológicos de las cerdas

5.1.1. Diagnóstico previo para detección de anticuerpos frente a toxina Apx IV

Todas las cerdas muestreadas de la Granja A, previamente al estudio, resultaron positivas serológicamente a la toxina ApxIV, indicando su exposición previa a la bacteria, confirmando por tanto la positividad de la granja a *A. pleuropneumoniae*.

Por el contrario, las 30 cerdas muestreadas previamente de la Granja B resultaron negativas a la presencia de anticuerpos frente a dicha toxina, confirmando así la negatividad de la granja a la bacteria.

5.1.2. Serología para detección de anticuerpos específicos de serotipo

Las 7 cerdas del grupo A, en el muestreo a las 24 horas del parto, presentaron los siguientes resultados:

- Cinco presentaron anticuerpos frente al serogrupo 1-9-11.
- Una presentó anticuerpos frente al serotipo 2 y dos resultaron dudosas.
- Cuatro presentaron anticuerpos frente al serogrupo 3-6-8-15-17, y dos resultaron dudosas.
- Ninguna presentó anticuerpos frente a los serotipos 5 y 10.
- Tres presentaron anticuerpos frente al serogrupo 4-7-18 y una resultó dudosa.
- Dos presentaron anticuerpos frente al serotipo 12.
- Cinco presentaron anticuerpos frente al serotipo 13 y una resultó dudosa.

Tabla 5. Resultados de las pruebas ELISA específicas de serotipo en las cerdas del grupo A

RESULTADOS SEROLOGIA SEROTIPOS CERDAS GRUPO 1									
Id. Cerda	Paridad	1-9-11	2	3-6-8-15-17	5	4-7-18	10	12	13
6317	6	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
6461	5	NEGATIVO	NEGATIVO	DUDOSO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	DUDOSO
6759	4	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	DUDOSO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
7429	3	POSITIVO	DUDOSO	DUDOSO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
7553	3	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
7919	2	POSITIVO	DUDOSO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
8370	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

La presencia de anticuerpos frente a estos serotipos sugiere que la granja era positiva a una diversidad de serotipos de tal modo que todas las cerdas, a excepción de la cerda

8370, han tenido contacto con alguna cepa productora de las toxinas ApxI-III y ApxIV y con la proteína de membrana OmpA. Si bien hay que tener en cuenta que, además de la cerda 8370, una de las cerdas no tuvo contacto con serotipos productores de toxina ApxI y presenta una baja positividad frente a serotipos productores de ApxII y ApxIII (cerda 6461).

5.1.3. Serología para detección de anticuerpos frente a toxinas ApxI, ApxII, ApxIII, ApxIV y proteína OmpA

Todas las cerdas presentaron anticuerpos frente a las toxinas ApxII y ApxIII, así como frente a la proteína OmpA. Sin embargo, 3 de las 7 cerdas no presentaron valores S/P por encima del punto de corte para la toxina ApxI, especialmente la cerda 8370, la cual fue la única que no presentó un valor S/P superior al punto de corte para la toxina ApxIV.

Tabla 6. Resultados de todas las pruebas ELISA, en valor S/P, de las cerdas del grupo A a las 24 horas del parto.

RESULTADOS CERDAS GRUPO A						
Id. Cerda	Paridad	Valor S/P ApxI	Valor S/P ApxII	Valor S/P ApxIII	Valor S/P ApxIV	Valor S/P OmpA
6317	6	0,235	2,915	1,926	1,544	1,391
6461	5	0,810	2,452	0,752	1,577	1,088
6759	4	0,796	3,126	1,004	1,474	0,604
7429	3	1,321	2,567	1,213	1,756	1,229
7553	3	0,213	1,877	0,565	1,546	1,221
7919	2	0,346	2,675	0,523	1,653	1,421
8370	1	0,069	1,027	0,410	0,335	1,196

Los valores medios del valor S/P de estas cerdas frente a la toxina ApxI fueron de 0,541 (SD=0,449 e IC95% de 0,126 a 0,956), frente a la toxina ApxII fueron de 2,377 (SD=0,713 e IC95% de 1,717 a 3,037), frente a la toxina ApxIII fueron de 0,913 (SD=0,529 e IC95% de 0,425 a 1,402), frente a la toxina ApxIV de 1,412 (SD=0,484 e IC95% de 0,965 a 1,859) y frente a la proteína OmpA de 1,164 (SD=0,272 e IC95% de 0,912 a 1,416).

Tabla 7. Prevalencias y principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones de los niveles de anticuerpos presentes en las cerdas del grupo A.

RESULTADOS CERDAS GRUPO A					
	Valor S/P ApxI	Valor S/P ApxII	Valor S/P ApxIII	Valor S/P ApxIV	Valor S/P OmpA
Media	0,541	2,377	0,913	1,412	1,164
SD	0,449	0,713	0,529	0,484	0,272
Min	0,069	1,027	0,410	0,335	0,604
Max	1,321	3,126	1,926	1,756	1,421
Mediana	0,346	2,567	0,752	1,546	1,221
Positivos	57,1%	100%	100%	85,7%	100%

Si bien únicamente se analizan 7 muestras, los resultados para las 5 pruebas presentan una distribución normal según análisis con el método de Shapiro-Wilk, así como una varianza homogénea según la prueba de Levene, excepto para la prueba ELISA ApxIV, dado el bajo valor que presenta la cerda 8370 respecto al resto, no obstante, los resultados que ofrecen estos datos con la prueba ANOVA son equivalentes a la prueba de Kruskal-Wallis, detectando con ambos las mismas diferencias.

Así, tras comparar las medias del valor S/P mediante Análisis de la Varianza (ANOVA) con test de Bonferroni para comparaciones múltiples, se detecta una diferencia estadísticamente significativa entre el valor S/P de la prueba frente a la toxina ApxII y el valor S/P obtenido con el resto de las pruebas ($p < 0,05$), así como entre la prueba frente a la toxina ApxI y la toxina Apx IV ($p < 0,05$), no detectando diferencias significativas en los valores S/P entre el resto de las pruebas.

5.2. Cultivo y determinación de serotipo en cebo

Los cinco pulmones procedentes de animales con síntomas clínicos compatibles con pleuroneumonía porcina presentaban a nivel macroscópico una pleuroneumonía necrótico-hemorrágica con pleuritis fibrinosa, y en el cultivo para bacterias NAD-dependientes se detectó crecimiento de *A. pleuropneumoniae*. Subsecuentemente mediante técnica PCR se identificó como serotipo 17 perteneciente al biovar 1, presentando resultado positivo para la toxina ApxII y la proteína de membrana OmpAII. Los resultados del antibiograma, realizado mediante el método de Kirby-Bauer, mostraron sensibilidad a penicilina, ampicilina, amoxicilina, tetraciclina, doxiciclina, espectinomicina, sulfamidas, sulfamidas con trimetoprim, amoxicilina con ácido clavulánico, cefalexina, florfenicol, tiamulina, tilosina, eritromicina, apramicina, lincomicina, estreptomomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina,

ceftiofur, cefquinoma, colistina, flumequina, enrofloxacin, marbofloxacin y tulatromicina; no detectándose resistencia a ningún antibiótico.

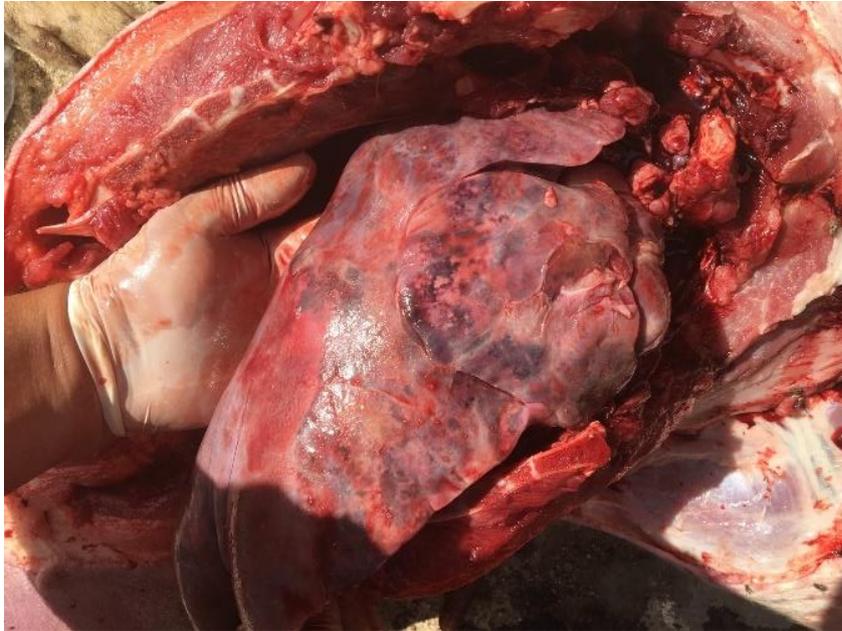


Figura 2. Pulmón con lesiones características de APP procedente de la estructura A.

5.3. Evaluación clínica lechones Grupo A

En las evaluaciones semanales realizadas no se observó ningún síntoma respiratorio en los animales del grupo A durante la duración del estudio.

Cabe reseñar la aparición de un brote agudo de pleuroneumonía porcina en los animales que no participaban en el estudio, pero estaban alojados en la misma nave, dos semanas tras la finalización de la prueba, en la 20ª semana de edad. Ninguno de los animales incluidos en el estudio presentó sintomatología clínica.

5.4. Resultados serológicos lechones Grupo A

Del grupo A causaron baja por mortalidad durante la primera semana de vida los lechones 33 y 35, procedentes ambos de la cerda 8370, por lo que el grupo finalmente quedó conformado por 40 animales.

El punto de corte establecido para cada una de las diferentes pruebas serológicas se establece gráficamente como una línea roja horizontal en todos los gráficos de análisis de resultados.

5.4.1. Resultados prueba serológica Apx I grupo A

En primer lugar, se observa una reducción en el nivel de anticuerpos maternos (MDA) frente a la toxina ApxI con la edad ($p < 0,001$), partiendo de valores S/P medios de 0,733 (SD=0,711 e IC95% de 0,505 a 0,960) a las 24 horas de vida y acabando con valores de 0,050 (SD=0,144 e IC95% de 0,004 a 0,096) a las 10 semanas de vida, encontrando en este punto de muestreo aún 4 animales con valor S/P positivos (superiores al punto de corte establecido en un valor S/P de 0,3). La siguiente tabla muestra los estadísticos de centralidad y dispersión en cada uno de los muestreos:

Tabla 8. Principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones de los niveles de inmunidad maternal frente a la toxina ApxI según la edad.

Edad	24 H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Media	0,733	0,459	0,189	0,175	0,118	0,096	0,063	0,041	0,044	0,041	0,050
SD	0,711	0,558	0,280	0,335	0,232	0,226	0,159	0,107	0,131	0,123	0,144
Min	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Max	2,502	2,100	1,221	1,336	0,874	0,974	0,687	0,432	0,644	0,630	0,659
Mediana	0,418	0,279	0,099	0,044	0,017	0	0	0	0	0	0
Positivos	65%	47,5%	20,0%	17,5%	15,0%	15,0%	10,0%	7,5%	5,0%	5,0%	10,0%

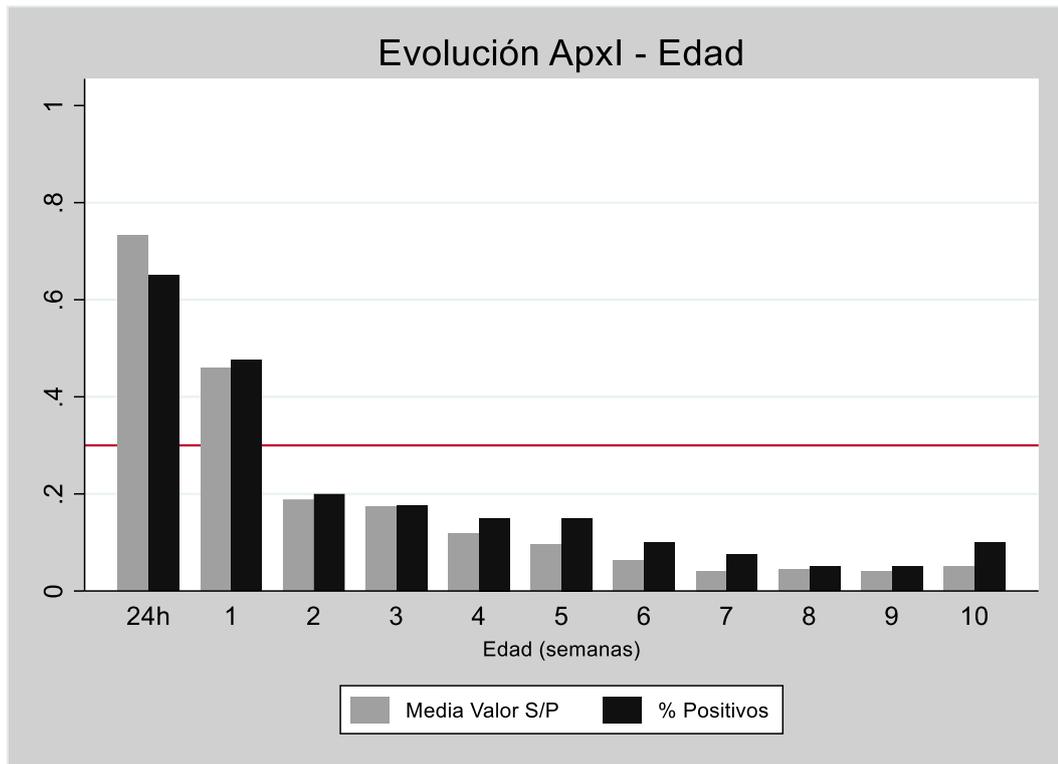


Figura 3. Representación gráfica de la evolución por semanas del nivel medio anticuerpos frente a la toxina Apxl y del % de positivos detectados por la prueba.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos de los 40 animales estudiados, a las 24 horas de vida se detectan 26 lechones (65%) con valores positivos, viendo como la media del valor S/P pasa a ser inferior a dicho punto a la segunda semana de vida, momento en el que la frecuencia de lechones positivos ya se ha reducido a un 20%.

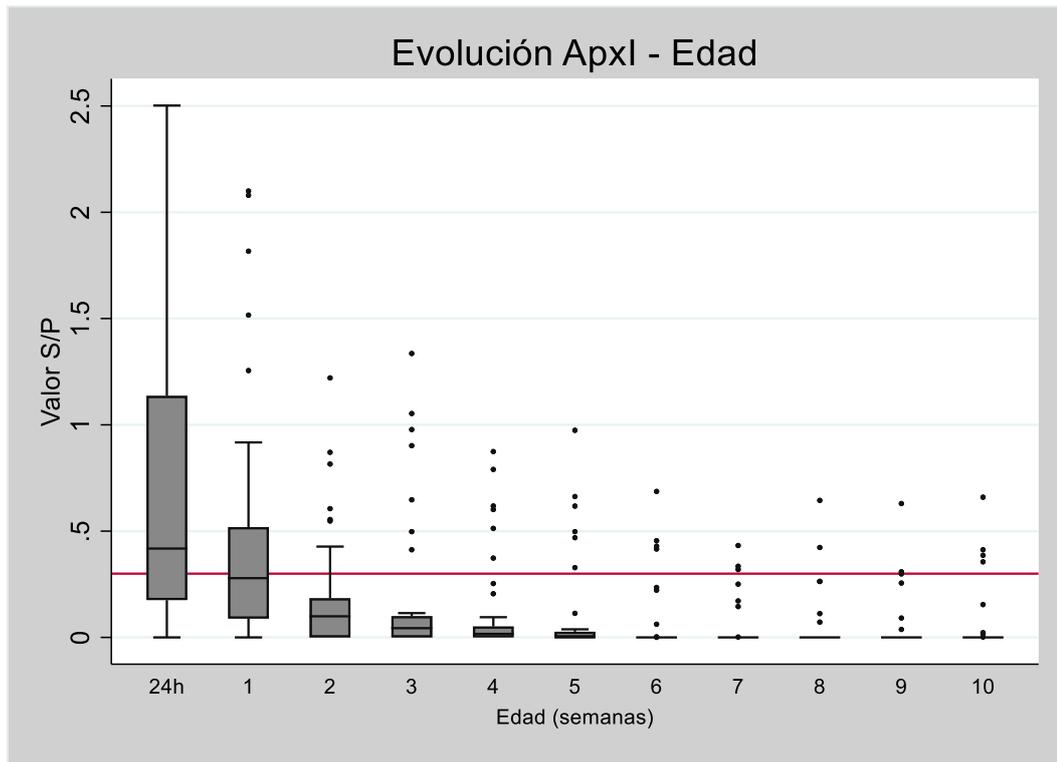


Figura 4. Gráfico de cajas y bigotes con la evolución de los valores S/P frente a la toxina Apxl de cada individuo agrupados por edad, desde las 24 horas de vida hasta las 10 semanas de vida.

La edad y el nivel de MDA presente en los lechones están relacionados de forma decreciente ($p < 0,001$), con un coeficiente de correlación de Spearman (r_s) de $-0,579$ (IC95% de $-0,638$ a $-0,513$).

Mediante regresión lineal simple, con estos datos para la Apxl, se observa un descenso semanal en el nivel de MDA de $0,043$ a $0,063$ (IC95%), medido en valor S/P medio ($p < 0,001$) con un coeficiente R^2 de $0,187$.

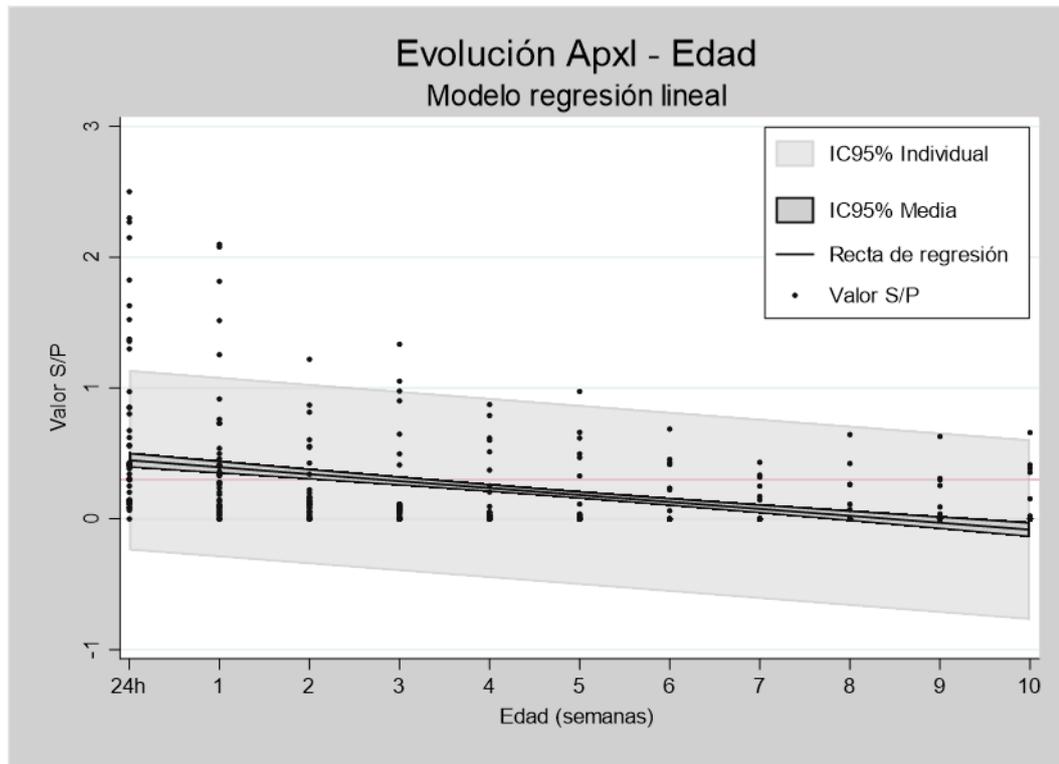


Figura 5. Modelo de regresión lineal con predicción del nivel de anticuerpos frente a la toxina ApxI (en valor S/P) en función de la edad de los lechones.

Por otro lado, analizando los valores en los lechones a las 24 horas de vida, si bien se observa una cierta diferencia en el nivel de MDA para ApxI entre machos y hembras, siendo este valor más elevado en las hembras, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

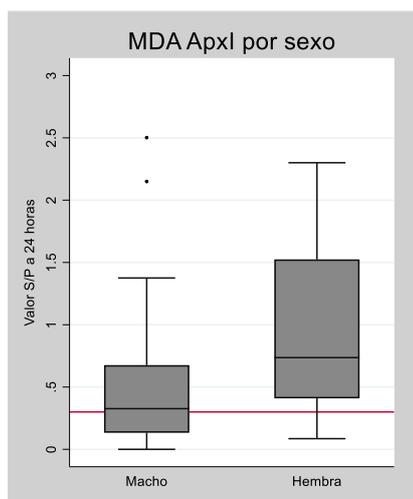


Figura 6. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad materna frente a la toxina ApxI a las 24 horas según el sexo.

Sin embargo, el nivel de anticuerpos frente a esta toxina presente en las madres sí que presenta una asociación significativa con el nivel de MDA frente a ApxI presente en los lechones a las 24 horas de vida ($p < 0,001$), estando ambos valores correlacionados de forma creciente con un $r_s = 0,696$ (IC95% de 0,491 a 0,828), estimando mediante un modelo de regresión que por cada punto que sube el valor S/P en el nivel de anticuerpos en las madres, el nivel de anticuerpos calostrales en los lechones a las 24 horas se eleva en un valor S/P de 0,94 a 1,66 (IC95%). Es remarcable el hecho de que en algunos lechones el nivel detectado de anticuerpos es incluso superior al de su progenitora.

Si tomamos todos los datos en conjunto, mediante un modelo de regresión múltiple ajustado por la edad en semanas de los lechones y por el valor S/P de la madre el día posterior al parto se puede determinar que la ecuación que mejor ajusta a los valores de MDA en lechones frente a ApxI, con un valor R^2 ajustado de 0,444, viene determinada por:

$$\text{valor S/P lechón} = 0,177 + 0,480 * \text{valor S/P madre} - 0,053 * \text{Edad}$$

Este modelo presenta un mayor coeficiente Beta estandarizado para la variable Valor S/P de la madre que para la variable Edad, lo que sugiere una mayor influencia del nivel de anticuerpos de la madre sobre el nivel de anticuerpos maternos de los lechones del que puede suponer la edad de estos.

No obstante, el modelo de regresión que mejor ajusta a los datos obtenidos, con un R^2 ajustado de 0,646 se obtiene mediante un modelo polinómico fraccional multivariable tal y como se puede observar en el siguiente gráfico que incluye la línea de regresión proporcionada por ambos modelos.

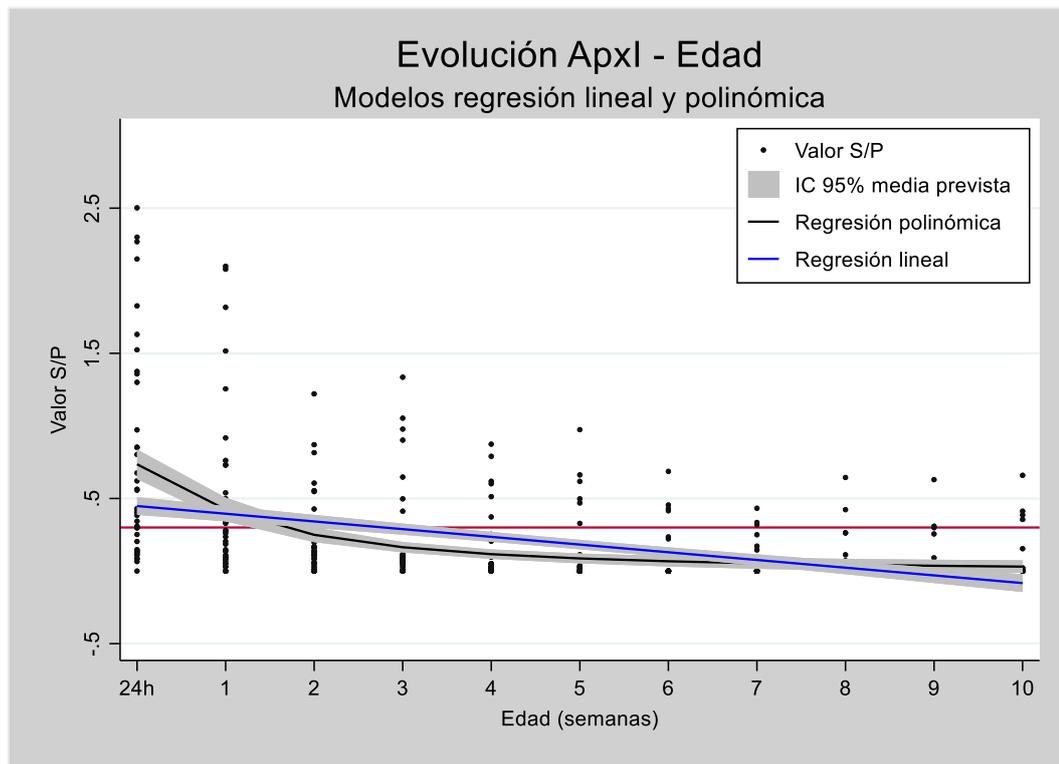


Figura 7. Modelos de regresión lineal y polinómico fraccional con predicción del nivel de anticuerpos frente a la proteína ApxI (en valor S/P) en función de la edad de los lechones.

Respecto a los valores obtenidos intracamada a las 24 horas, se observan diferencias significativas en los valores S/P obtenidos en función de la camada de la que provengan ($p < 0,001$) tanto en la cantidad de MDA como en la variabilidad individual entre los lechones de la misma camada, tal y como se puede observar en el intervalo intercuartílico del gráfico de cajas y bigotes o en los valores de desviación estándar del valor S/P en los lechones a las 24 horas agrupados por camada (ver anexo 11.5), lo que queda confirmado mediante la prueba de Levene, ya que las varianzas de los valores S/P comparados entre las diferentes camadas no son homogéneas ($p < 0,05$).

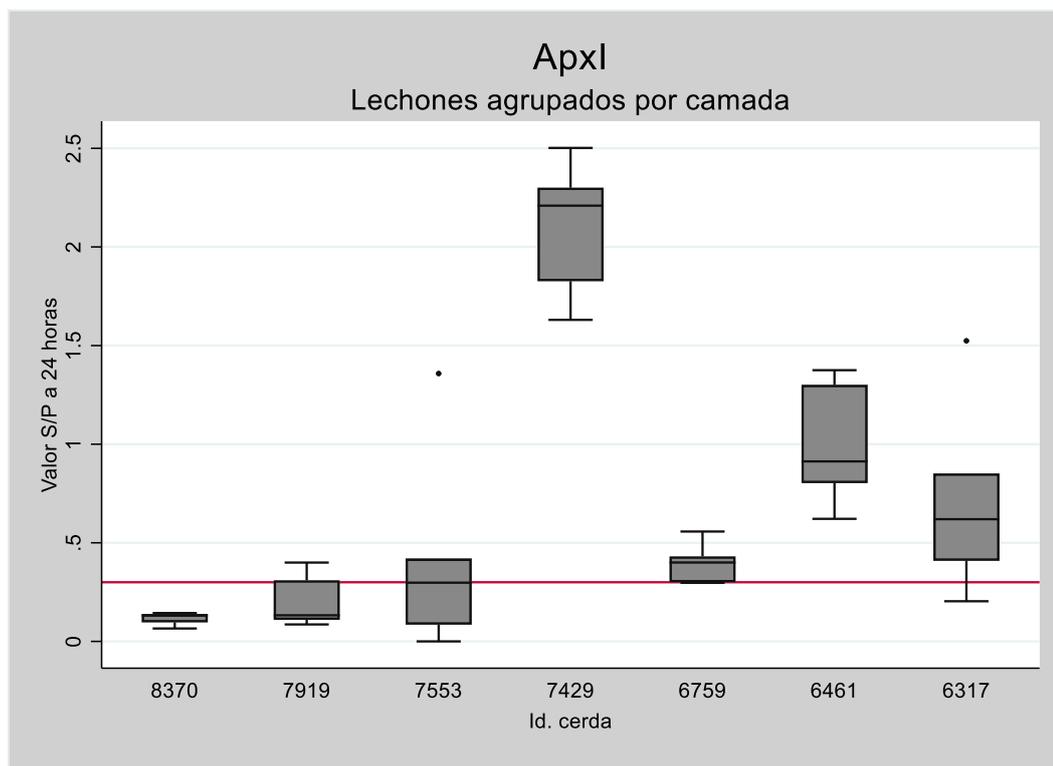


Figura 8. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad materna frente a la toxina ApxI a las 24 horas según la camada.

Respecto a los niveles de MDA en función de la paridad de las cerdas se observa una asociación significativa entre ambos ($p < 0,01$), estando correlacionados de forma creciente el valor S/P de los lechones a las 24 horas de vida con la paridad de las cerdas ($r_s = 0,464$ (IC95% de 0,178 a 0,678)).

Si bien no se ha analizado un número suficiente de camadas como para tener unos datos sólidos de MDA frente a la toxina ApxI en relación a la paridad (prácticamente sólo hay una cerda de cada paridad), si clusterizamos los resultados en dos grupos, teniendo por un lado cerdas de 1º y 2º parto, con un valor S/P medio de 0,164 (SD=0,334 e IC95% de 0,088 a 0,240) y por otro cerdas con 3 o más partos, con un valor S/P medio de 0,922 (SD=0,132 e IC95% de 0,651 a 1,194), se detectan unos niveles medios significativamente más bajos ($p < 0,05$) de MDA en lechones procedentes de cerdas de primer y segundo parto respecto a los procedentes del resto de paridades.

Tabla 9. Valor S/P medio frente a toxina ApxI en lechones a las 24 horas agrupados según la paridad de la madre.

Paridad	Media	SD	IC95% (Media valor S/P)	
			inf	sup
1-2	0,164	0,334	0,088	0,240
3-6	1,594	0,132	0,651	1,194

5.4.1.1. Resultados prueba serológica Apx I grupo A, subgrupo ApxI+

Una vez analizados los datos de todos los lechones del estudio, para un mejor análisis de la evolución de los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxI, se procede a realizar un subgrupo de lechones (subgrupo ApxI+), formado únicamente por aquellos animales que presentaban un valor S/P superior a 0,3 a las 24 horas de vida, compuesto por 26 lechones, con los estadísticos de centralidad y dispersión que se muestran en la tabla.

Tabla 10. Principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones de los niveles de inmunidad maternal frente a la toxina ApxI según la edad en el subgrupo ApxI+.

Edad	24H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Media	1,048	0,653	0,281	0,262	0,174	0,143	0,096	0,064	0,068	0,062	0,077
SD	0,700	0,605	0,311	0,390	0,273	0,270	0,190	0,128	0,159	0,149	0,173
Min	0,309	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Max	2,502	2,100	1,221	1,336	0,874	0,974	0,687	0,432	0,644	0,630	0,659
Mediana	0,827	0,403	0,149	0,082	0,028	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Positivos	100%	69,2%	30,8%	26,9%	23,1%	23,1%	15,4%	11,5%	7,7%	7,7%	15,4%

Así pues, la vida media para los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxI, entendida como el tiempo durante el cual los niveles iniciales de anticuerpos se reducen en un 50%, según los resultados obtenidos con los lechones de este subgrupo se estima en 9,56 días.

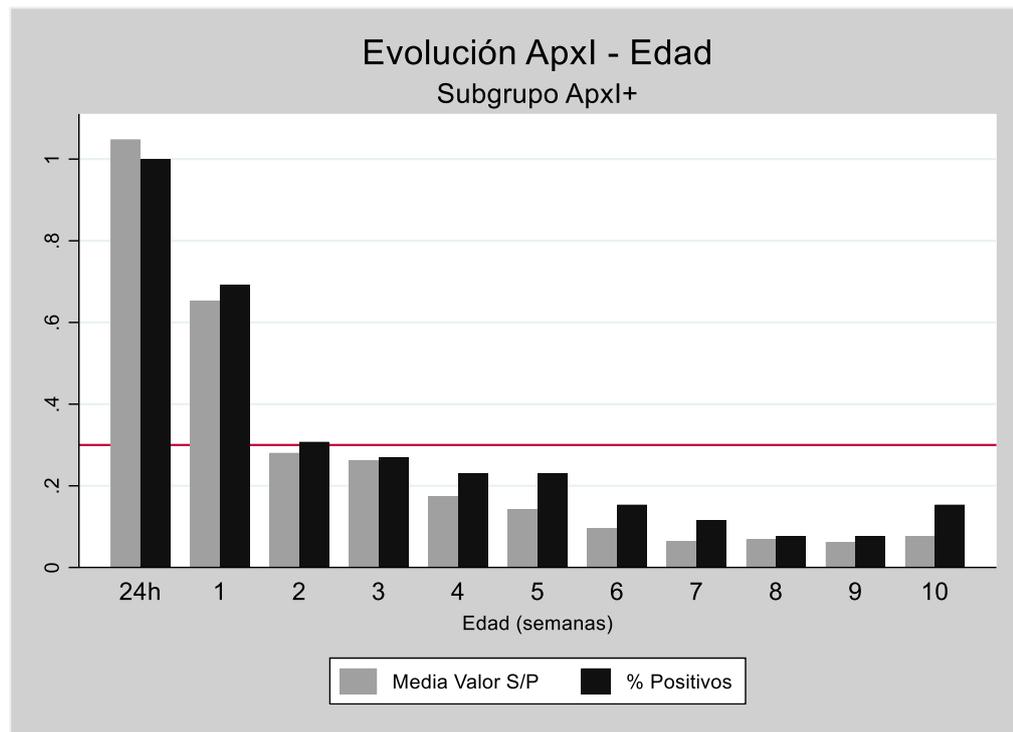


Figura 9. Representación gráfica de la evolución por semanas del nivel medio anticuerpos frente a la toxina ApxI y del % de positivos detectados por la prueba en el subgrupo ApxI+.

Teniendo en cuenta todas las edades de muestreo, en los animales que presentaban inmunidad materna a las 24 horas frente a la toxina ApxI, mediante regresión lineal simple, se observa un descenso semanal en el nivel de MDA de 0,061 a 0,090 (IC95%), medido en valor S/P medio ($p < 0,001$), con un R^2 del modelo de 0,274, estando la edad de los lechones y el nivel de MDA asociados linealmente de forma negativa ($p < 0,001$), con un coeficiente de correlación de Spearman (r_s) de -0,616 (IC95% de -0,683 a -0,538).

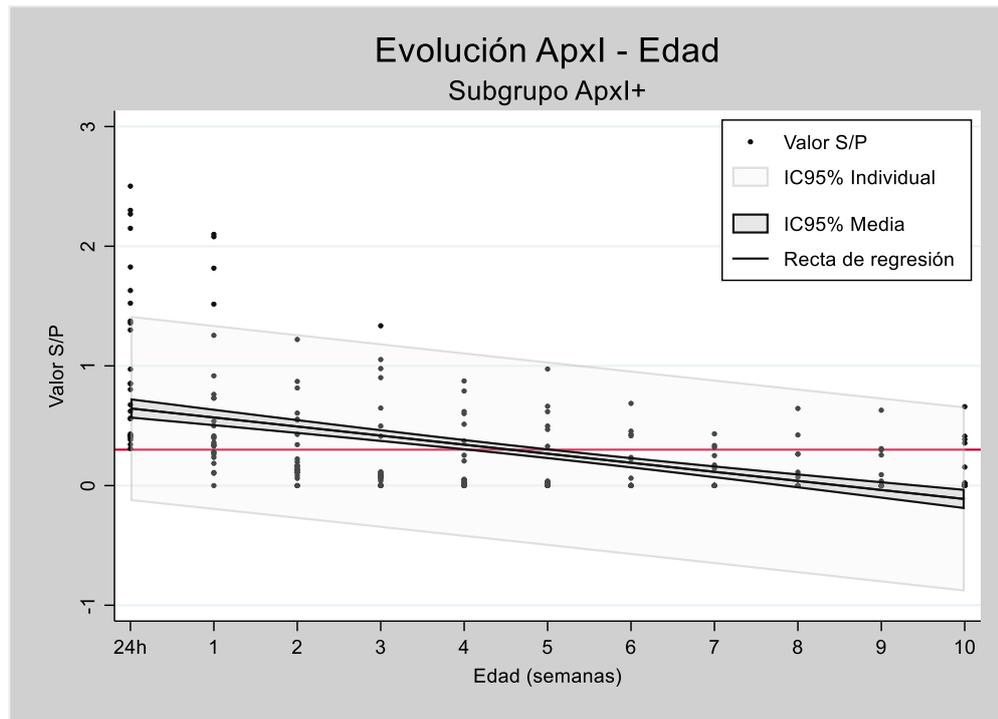


Figura 10. Modelo de regresión lineal en el subgrupo ApxI+, con predicción del nivel de anticuerpos frente a la toxina ApxI (en valor S/P) en función de la edad de los lechones.

En el caso de tener en cuenta únicamente los animales del subgrupo ApxI+, tampoco es significativa la diferencia en el nivel de MDA a las 24 horas de vida frente a la ApxI entre ambos sexos.

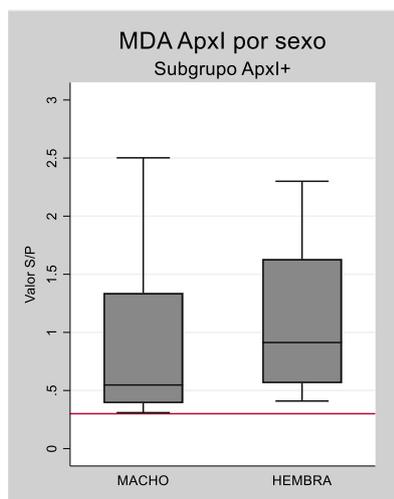


Figura 11. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad materna frente a la toxina ApxI a las 24 horas según el sexo en el subgrupo ApxI+.

Si para la elaboración del mismo modelo de regresión múltiple ajustado por edad y nivel de anticuerpos de la madre, tomamos únicamente los lechones del subgrupo ApxI+, la ecuación que mejor ajusta a los valores de MDA en lechones frente a ApxI, con un R^2 ajustado de 0,493 viene determinada por:

$$\text{valorS/P lechón} = 0,275 + 0,52 * \text{valor S/P madre} - 0,076 * \text{Edad}$$

En este modelo de regresión múltiple ajustado por edad de los lechones y nivel de anticuerpos de sus progenitoras, si bien hay una influencia muy importante del nivel de anticuerpos en las cerdas sobre el nivel de MDA, a diferencia del modelo que incluye todos los animales del grupo, es más importante el efecto que ejerce la edad de los lechones sobre el nivel de MDA, con un residuo Beta estandarizado más alto.

No obstante, al igual que en el caso anterior, el modelo polinómico fraccional multivariable, con un R^2 de 0,733 es el que mejor ajusta los resultados obtenidos en la evolución de los anticuerpos maternos en los animales del subgrupo ApxI+, tal y como se puede observar en el gráfico:

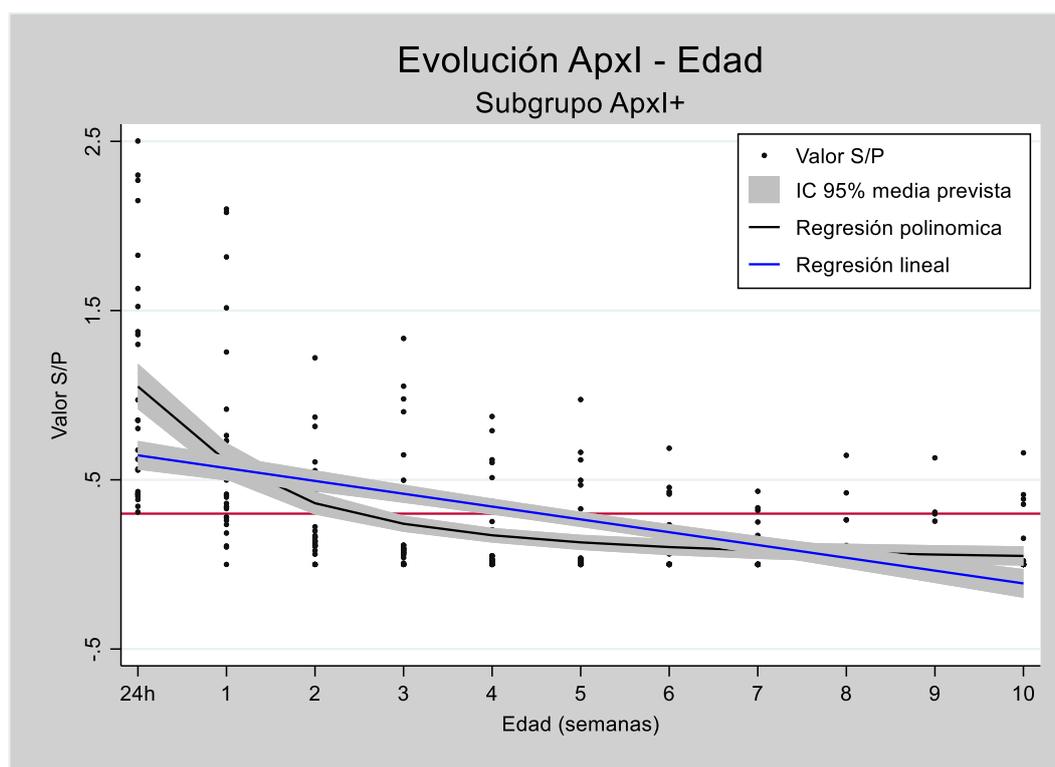


Figura 12. Modelos de regresión lineal y polinómico fraccional con predicción del nivel de anticuerpos frente a la proteína Apxl (en valor S/P) en función de la edad de los lechones en el subgrupo Apxl+.

5.4.2. Resultados prueba serológica Apx II grupo A

A las 24 horas de vida el 100% de los lechones analizados tenían valores elevados de MDA frente a la toxina ApxII, presentando el lechón con nivel más bajo de anticuerpos un valor S/P de 1,435 y llegando el lechón con un nivel más elevado a tener un valor S/P de 4,050, siendo positivos el 100% de los lechones. El primer lechón con un valor inferior al punto de corte aparece a la semana 5 de vida, presentando aún a la semana 10 de vida un 42,5% de los lechones resultados positivo.

Tabla 11. Principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones de los niveles de inmunidad maternal frente a la toxina ApxII según la edad.

Edad	24H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Media	2,907	2,701	2,290	2,078	1,801	1,540	1,187	0,825	0,619	0,413	0,383
SD	0,790	0,913	1,074	1,113	1,175	1,083	0,894	0,863	0,634	0,387	0,361
Min	1,435	1,199	0,606	0,429	0,366	0,127	0,098	0,000	0,000	0,000	0,000
Max	4,050	4,016	3,971	4,010	3,934	3,747	3,389	3,654	2,590	1,646	1,432
Mediana	2,894	2,783	2,042	1,824	1,424	1,200	0,814	0,501	0,367	0,269	0,244
Positivos	100%	100%	100%	100%	100%	97,5%	85%	68%	58%	47,5%	42,5%

En el caso de la evolución de los MDA frente a la ApxII, igualmente se observa una reducción del nivel de anticuerpos con la edad ($p < 0,001$), aunque en este caso partiendo de valores S/P medios más elevados a las 24 horas, en concreto de 2,907 (SD=0,790 e IC95% de 2,654 a 3,160), alcanzando a las 10 semanas de edad unos valores medios de 0,383 (SD=0,361 e IC95% de 0,267 a 0,498), lo que implica que a las 10 semanas de vida, los valores medios detectados de MDA están aún por encima del punto de corte establecido como positivo.

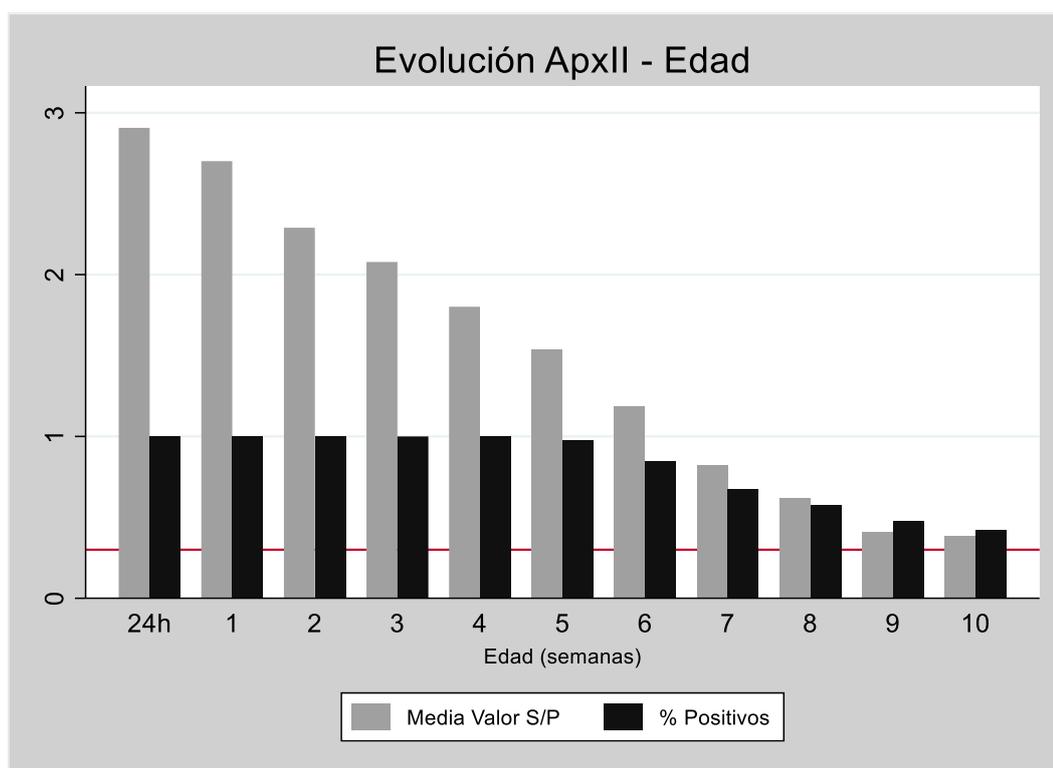


Figura 13. Representación gráfica de la evolución por semanas del nivel medio anticuerpos frente a la toxina ApxII y del % de positivos detectados por la prueba.

La vida media para los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxII según los resultados obtenidos se estima en 35,49 días, esto es, aproximadamente algo más de 5 semanas.

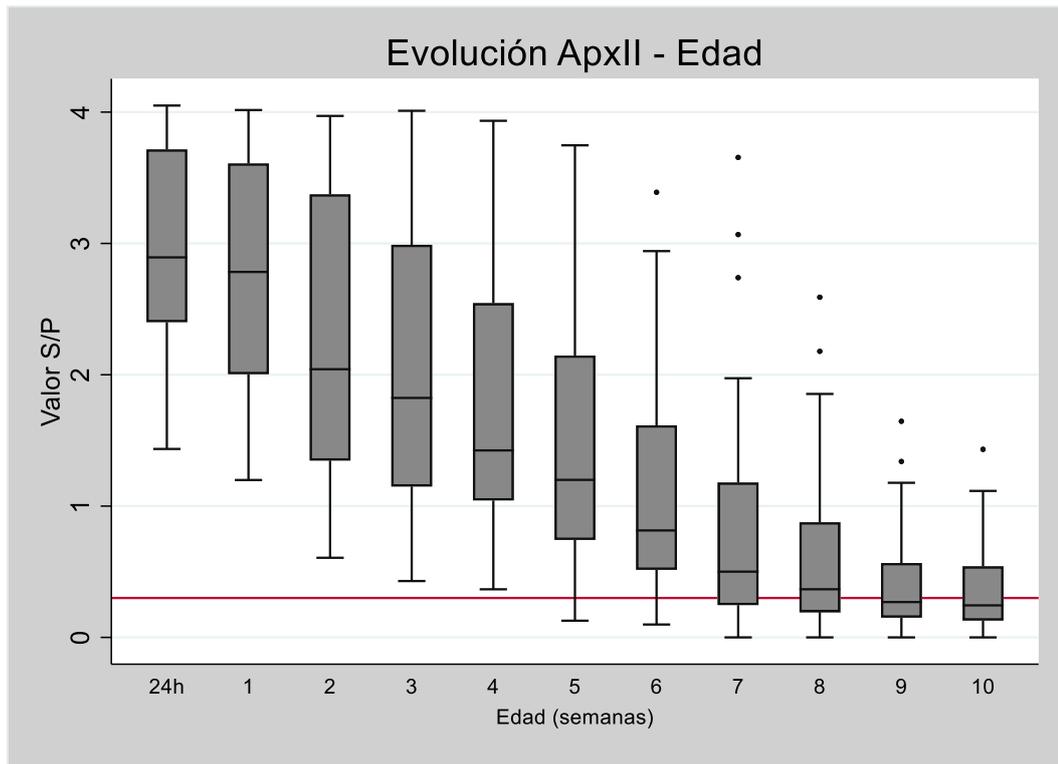


Figura 14. Gráfico de cajas y bigotes con la evolución de los valores S/P frente a la toxina ApxII de cada individuo agrupados por edad, desde las 24 horas de vida hasta las 10 semanas de vida.

Al igual que con la ApxI, la edad y el nivel de MDA frente a ApxII presente en los lechones están asociados de forma negativa ($p < 0,001$), con un coeficiente de correlación de Spearman (r_s) de $-0,743$ (IC95% de $-0,782$ a $-0,698$).

Mediante un modelo de regresión lineal simple, con estos datos para la ApxII, se observa un descenso semanal en el nivel de MDA de $0,246$ a $0,298$ (IC95%), medido en valor S/P medio ($p < 0,001$) con un coeficiente R^2 de $0,489$.

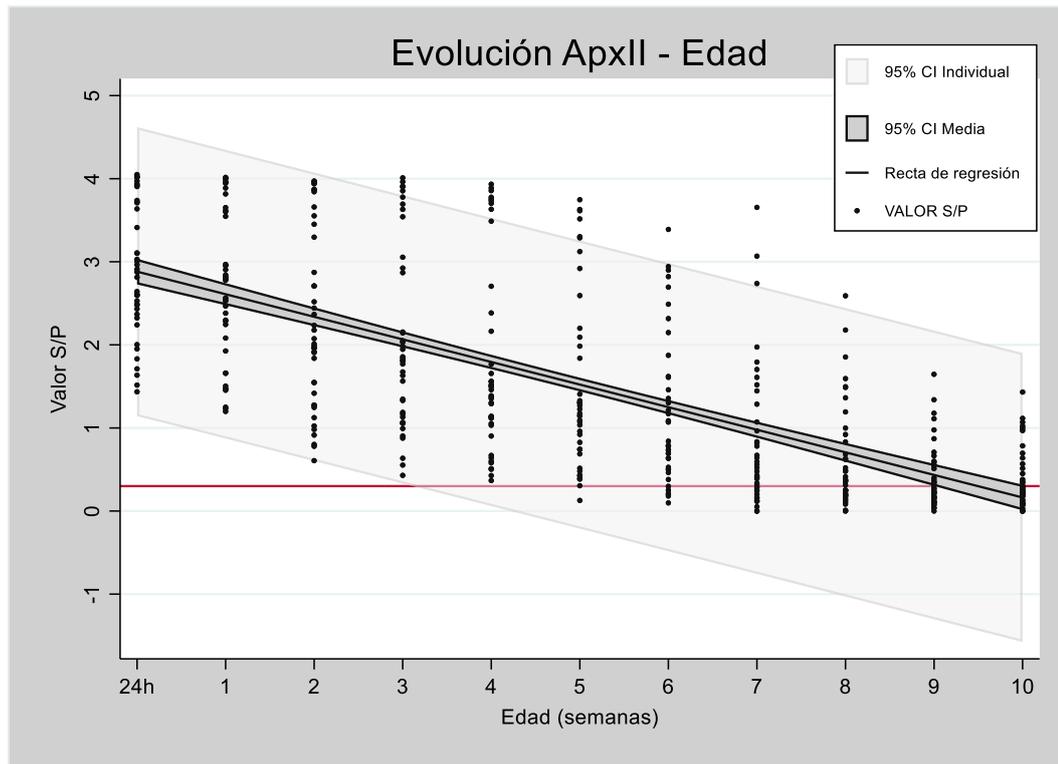


Figura 15. Modelo de regresión lineal con predicción del nivel de anticuerpos frente a la toxina ApxII (en valor S/P) en función de la edad de los lechones.

En el caso de los anticuerpos frente a la toxina ApxII, a las 24 horas de vida, no se observan diferencias en el valor S/P que presentan machos y hembras.

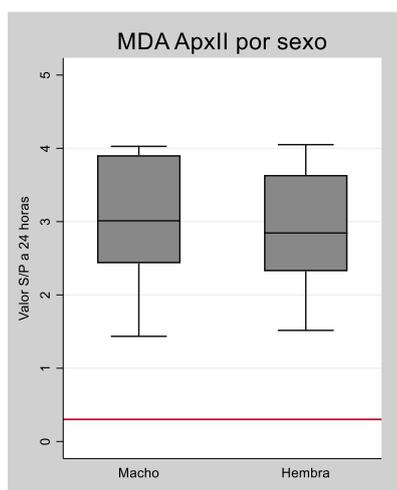


Figura 16. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad materna frente a la toxina ApxII a las 24 horas según el sexo.

El nivel de anticuerpos presentes en las madres presenta una asociación significativa con el nivel de MDA presente en los lechones a las 24 horas de vida ($p < 0,001$), estando ambos valores correlacionados de forma positiva con un $r_s = 0,738$ (IC95% de 0,554 a 0,853), estimando mediante un modelo de regresión, que por cada punto que se incrementa el valor S/P en las madres, el nivel de MDA en los lechones a las 24 horas se eleva en un valor S/P de 0,599 a 1,210 (IC95%).

Al igual que se observaba con el nivel de MDA frente a la toxina ApxI en lechones a las 24 horas, también en este caso se observan lechones con niveles de anticuerpos superiores a los de su progenitora.

Tomando los datos en conjunto, mediante un modelo de regresión múltiple ajustado por la edad en semanas de los lechones y por el valor S/P de la madre el día posterior al parto, se puede determinar que la recta que mejor ajusta a los valores de MDA en los lechones, con un R^2 de 0,584, viene determinada por la ecuación:

$$\text{valor S/P lechón} = 1,323 + 0,638 * \text{valor S/P madre} - 0,272 * \text{Edad}$$

En este modelo de regresión múltiple ajustado por edad de los lechones y nivel de anticuerpos de sus progenitoras, al igual que sucedía con el modelo para el subgrupo ApxI+, si bien hay una influencia muy importante del nivel de anticuerpos en las cerdas sobre el nivel de MDA, es más importante el efecto que ejerce la edad de los lechones sobre el nivel de MDA, con un residuo Beta estandarizado más alto.

En este caso, el modelo por regresión múltiple ajustado ofrece el mismo coeficiente de determinación (R^2) que el obtenido mediante el modelo polinómico fraccional multivariable.

Respecto a los valores obtenidos intra-camada a las 24 horas, también se observan diferencias significativas en los valores S/P obtenidos en función de la cerda de la que provienen ($p < 0,001$) tanto en la cantidad de MDA como en la variabilidad individual entre los lechones de la misma camada, observándose diferencias en la amplitud del intervalo intercuartílico del valor S/P entre las diferentes camadas, así como en los valores de desviación típica de los valores agrupados por camada (ver anexo 11.12),

confirmando mediante la prueba de Levene que las varianzas no son homogéneas ($p < 0,05$).

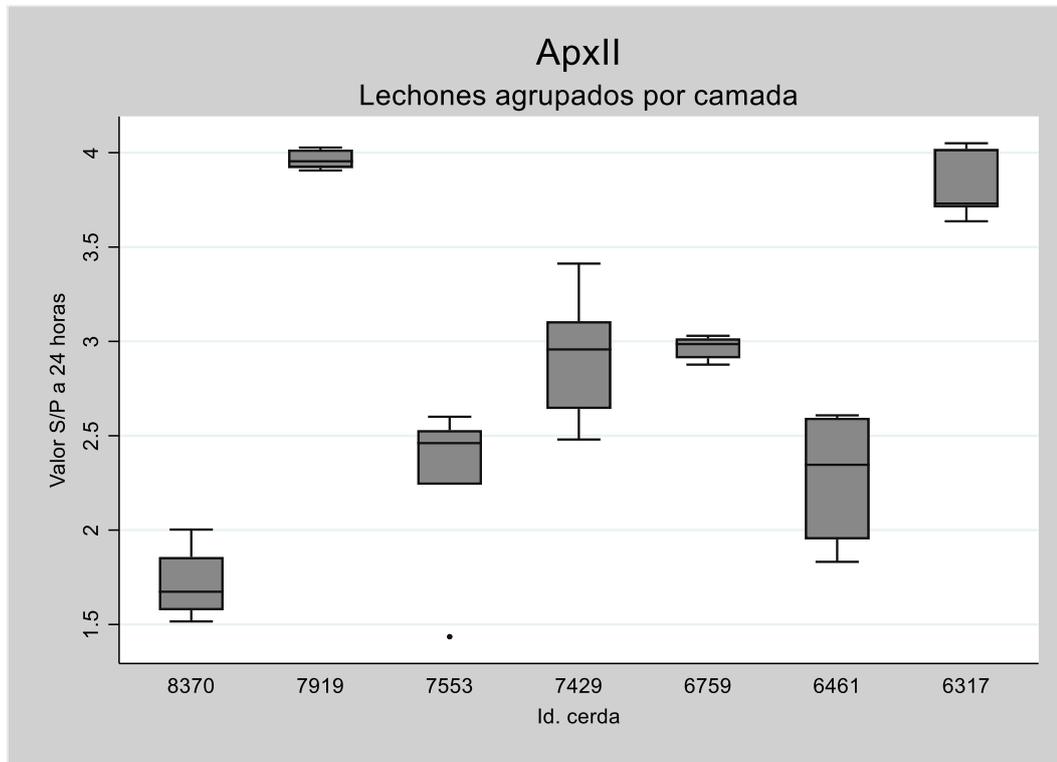


Figura 17. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad materna frente a la toxina ApxII a las 24 horas según la camada.

En el caso de los niveles de MDA frente a la toxina ApxII en función de la paridad de las cerdas, no se detecta asociación entre ambas variables, si bien no se ha analizado un número suficiente de camadas como para tener unos datos sólidos de MDA en relación a la paridad, sin embargo sí que se detectan unos niveles significativamente más bajos en los lechones procedentes en la cerda de primer parto respecto a los procedentes del resto de paridades, sin embargo, en este caso al agrupar las cerdas en dos clústeres según paridad no se detectan diferencias significativas, debido al elevado valor S/P que presentan los lechones procedentes de la cerda de segundo parto, lo que sugiere en este caso, que el tiempo que la cerda ha permanecido en granja no está necesariamente relacionado con un mayor nivel de MDA frente a la toxina ApxII en su descendencia.

Tabla 12. Valor S/P medio frente a toxina ApxII en lechones a las 24 horas agrupados según la paridad de la madre.

Paridad	Media	SD	IC95% (Media valor S/P)	
			inf	sup
1-2	3,064	1,167	2,230	3,899
3-6	2,854	0,637	2,617	3,092

5.4.3. Resultados prueba serológica Apx III grupo A

En el caso de los MDA frente a la toxina ApxIII, en términos de frecuencia de positivos (valor S/P > 0,3), a las 24 horas de vida solamente se encuentra un lechón con niveles por debajo del punto de corte por lo que hay un 97,5% de lechones positivos, no detectando animales positivos a las 10 semanas de edad, y encontrando el último animal con resultado positivo a la semana 6 de vida.

Tabla 13. Principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones de los niveles de inmunidad maternal frente a la toxina ApxIII según la edad.

Edad	24H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Media	1,098	0,765	0,442	0,349	0,300	0,206	0,150	0,105	0,086	0,073	0,061
SD	0,446	0,371	0,243	0,203	0,209	0,096	0,077	0,068	0,059	0,039	0,040
Min	0,150	0,115	0,079	0,037	0,000	0,028	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
Max	2,097	1,626	1,140	0,894	1,275	0,390	0,377	0,263	0,202	0,165	0,184
Mediana	1,101	0,727	0,371	0,320	0,270	0,213	0,160	0,076	0,080	0,069	0,061
Positivos	97,5%	92,5%	75,0%	58%	45%	18%	5%	0%	0%	0%	0%

Al igual que sucede con los anticuerpos maternos frente a ApxI y ApxII, se observa una reducción del nivel de anticuerpos con la edad ($p < 0,001$), partiendo a las 24 horas de unos niveles más parecidos a ApxI, aunque algo más elevados, en concreto de una media en valor S/P de 1,098 (SD=0,446 e IC95% de 0,956 a 1,241), alcanzando a las 10 semanas de edad unos valores medios del valor S/P de 0,061 (SD=0,040 e IC95% de 0,048 a 0,074), estando por tanto a las 10 semanas, al igual que en el caso de los MDA frente a ApxI, los valores medios por debajo del punto de corte de la prueba, llegando a observarse este valor S/P medio por debajo del punto de corte a partir de la semana 4 de edad.

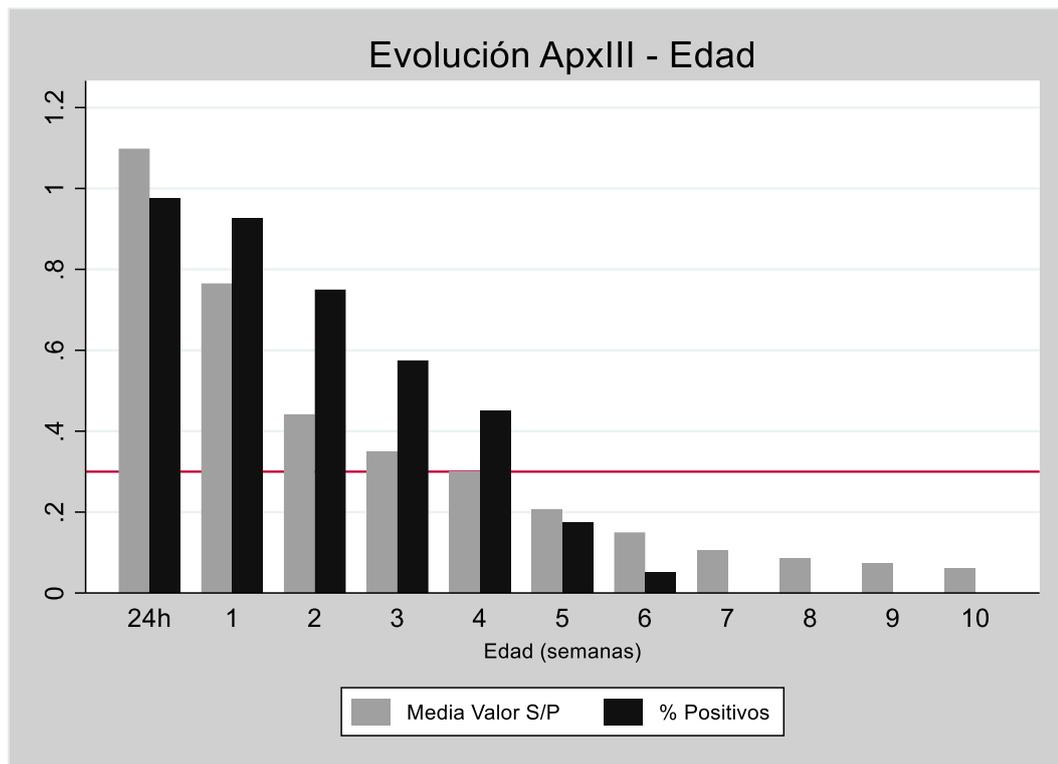


Figura 18. Representación gráfica de la evolución por semanas del nivel medio anticuerpos frente a la toxina ApxIII y del % de positivos detectados por la prueba.

En este caso, la vida media para los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxIII según los resultados obtenidos se estima en 11,79 días.

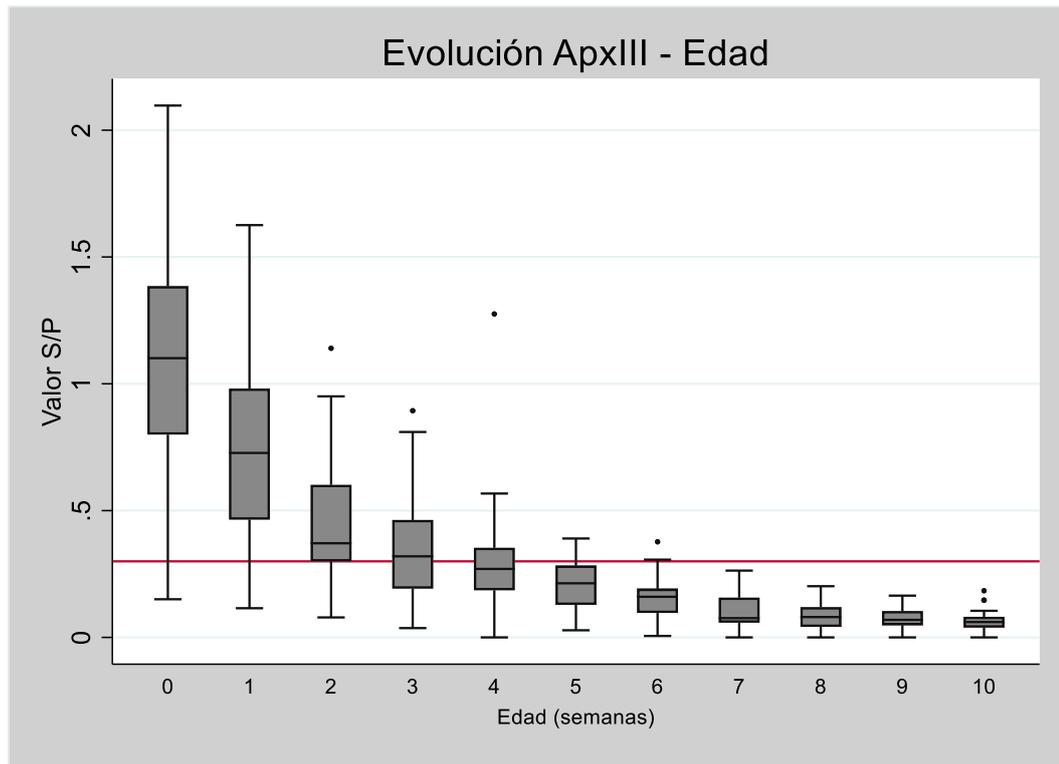


Figura 19. Gráfico de cajas y bigotes con la evolución de los valores S/P frente a la toxina ApxIII de cada individuo agrupados por edad, desde las 24 horas de vida hasta las 10 semanas de vida.

Al igual que sucede con los anticuerpos frente a ApxI y ApxII, la edad y el nivel de MDA presente en los lechones están asociados de forma negativa ($p < 0,001$), con un coeficiente de correlación de Spearman (r_s) de $-0,831$ (IC95% de $-0,858$ a $-0,800$), siendo este valor similar al obtenido con ApxII, siendo en ambos casos un coeficiente de correlación más elevado que para ApxI.

Mediante un modelo de regresión lineal simple, con estos datos para la ApxIII, con un coeficiente R^2 de $0,536$, se observa un descenso semanal en el nivel de MDA de $0,080$ a $0,095$ (IC95%), medido en valor S/P medio ($p < 0,001$), siendo estos valores más cercanos a los observados para los MDA frente a ApxI.

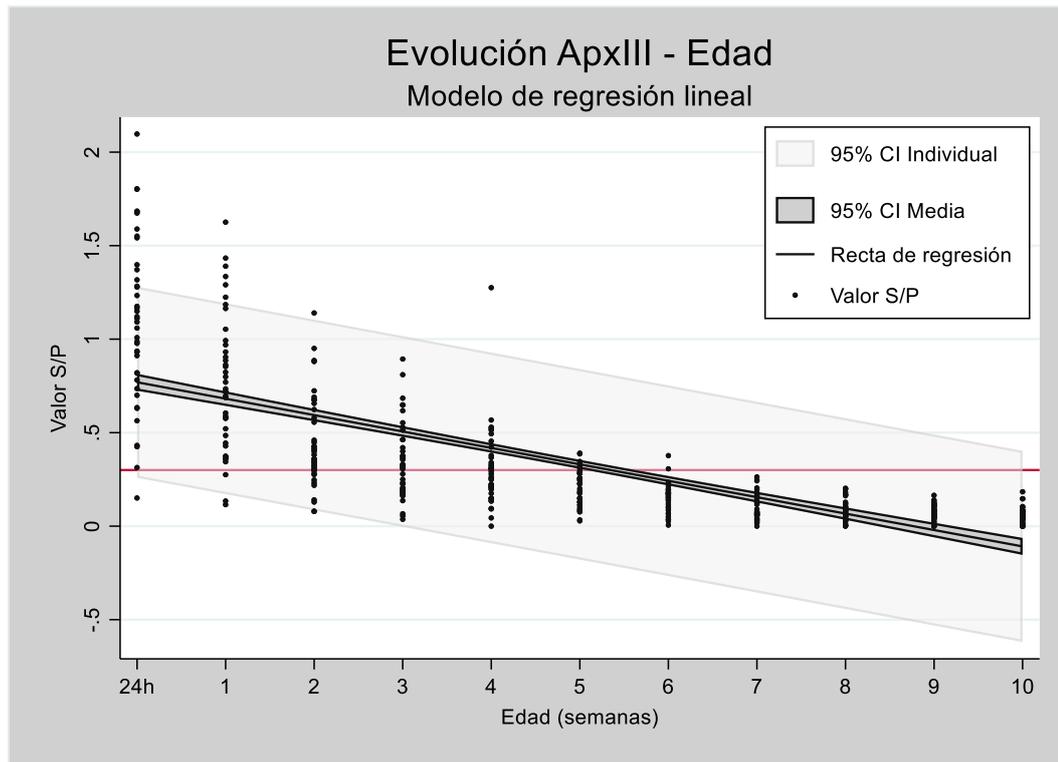


Figura 20. Modelo de regresión lineal con predicción del nivel de anticuerpos frente a la toxina ApxIII (en valor S/P) en función de la edad de los lechones.

En este caso, se observa una diferencia de 0,331 (IC95% 0,061 a 0,601) en el nivel de MDA para ApxIII entre machos y hembras, siendo este valor más elevado en las hembras, y siendo en este caso la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

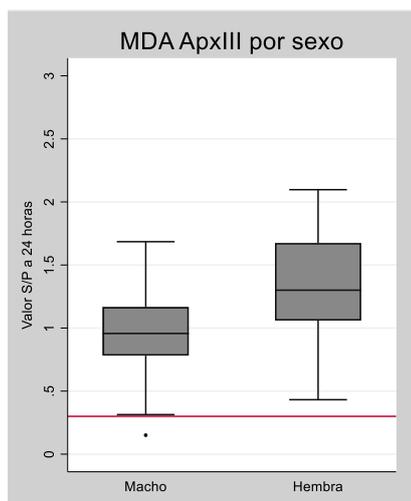


Figura 21. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad materna frente a la toxina ApxIII a las 24 horas según el sexo.

De la misma manera que sucede en los casos anteriores, el nivel de anticuerpos presentes en las madres presenta una asociación significativa con el nivel de MDA presente en los lechones a las 24 horas de vida ($p < 0,001$), estando ambos valores relacionados de forma positiva con un $r_s = 0,613$ (IC95% de 0,373 a 0,776), estimando mediante un modelo de regresión lineal, con un R^2 de 0,359 que por cada punto que se incrementa el valor S/P en las madres, el nivel de MDA en los lechones a las 24 horas se eleva en un valor S/P de 0,303 a 0,778 (IC95%). Es también remarcable, al igual que sucedía con los MDA frente a ApxI y ApxII, el hecho de que en algunos lechones el nivel detectado de anticuerpos es superior al de su progenitora.

Tomando los datos en conjunto, mediante un modelo de regresión múltiple ajustado por la edad en semanas de los lechones y por el valor S/P de la madre el día posterior al parto, se puede determinar que la recta que mejor ajusta a los valores de MDA en los lechones, con un R^2 ajustado de 0,589, viene determinada por la ecuación:

$$\text{valor S/P lechón} = 0,598 + 0,183 * \text{valor S/P madre} - 0,088 * \text{Edad}$$

En este modelo de regresión múltiple ajustado por edad de los lechones y nivel de anticuerpos de sus progenitoras, al igual que sucedía con el modelo para el subgrupo ApxI+ con los anticuerpos frente a la toxina ApxI, y con el modelo para la ApxII, si bien hay una influencia muy importante del nivel de anticuerpos en las cerdas sobre el nivel de MDA, es más importante el efecto que ejerce la edad de los lechones sobre el nivel de MDA, con un residuo Beta estandarizado más alto.

No obstante, al igual que sucede con los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxI, el modelo de regresión que mejor ajusta a los datos obtenidos, con un R^2 ajustado de 0,742, se obtiene mediante un modelo polinómico fraccional multivariable, tal y como se puede observar en el siguiente gráfico:

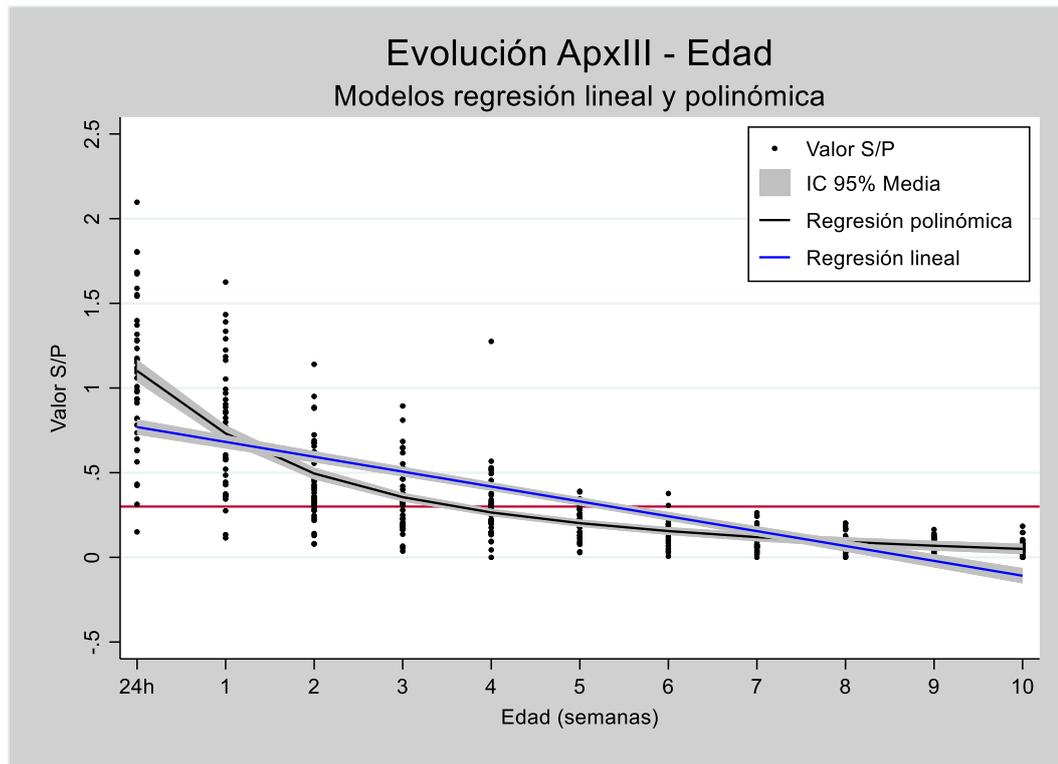


Figura 22. Modelos de regresión lineal y polinómico fraccional con predicción del nivel de anticuerpos frente a la proteína ApxIII (en valor S/P) en función de la edad de los lechones.

Respecto a los valores obtenidos intra-camada a las 24 horas, también se observan al igual que con ApxI y ApxII diferencias significativas en los valores S/P obtenidos en función de la cerda de la que provengan ($p < 0,001$) tanto en la cantidad de MDA como en la variabilidad individual entre los lechones de la misma camada, observándose en el diagrama de cajas y bigotes diferencias en la amplitud del intervalo intercuartílico del valor S/P entre las diferentes camadas, así como en los valores de desviación típica de los valores agrupados por camada (ver anexo 11.18), si bien en este caso, no se confirma mediante la prueba de Levene que las varianzas no sean homogéneas.

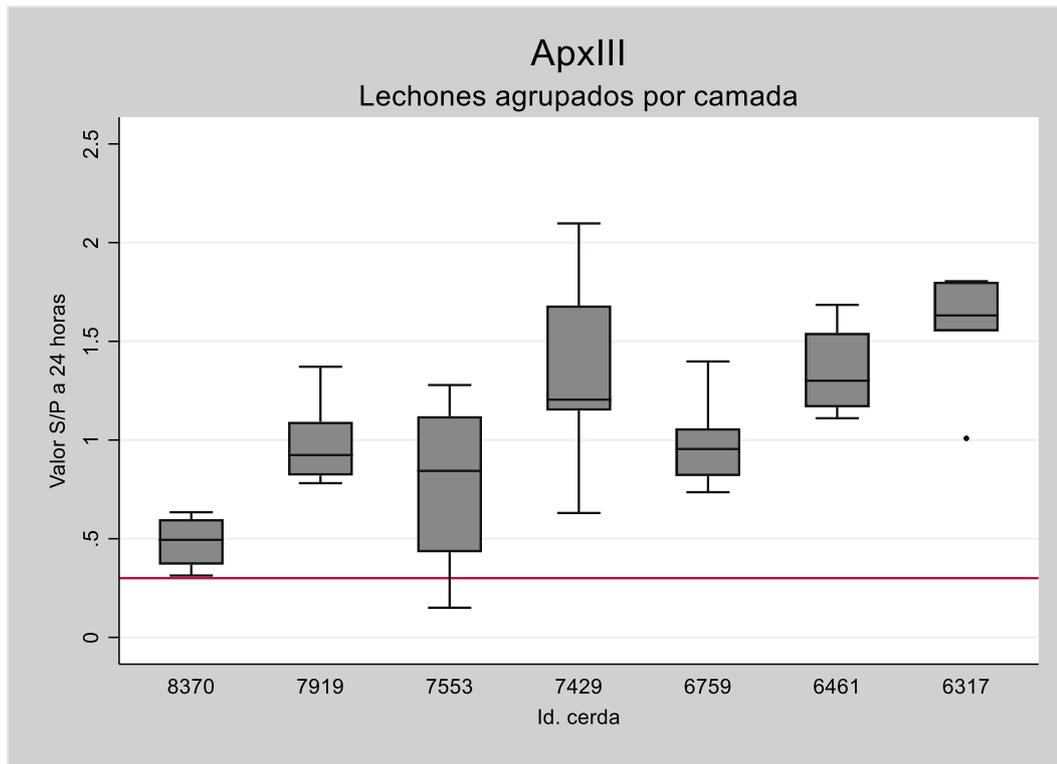


Figura 23. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad materna frente a la toxina ApxIII a las 24 horas según la camada.

De forma muy parecida a lo que sucedía con los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxI, si estudiamos los niveles de MDA frente a la ApxIII en función de la paridad de las cerdas, se detectan numéricamente unos niveles medios más bajos de MDA en lechones procedentes de la cerda de primer parto respecto a los procedentes del resto de paridades, y en este caso concreto, tal y como se observa en el gráfico de cajas y bigotes agrupados por cerdas y ordenados por paridad, el nivel de MDA en los lechones se incrementa con la paridad de la cerda estando correlacionados con un $r_s = 0,610$ (IC95% de 0,368 a 0,774).

Si clusterizamos los resultados en dos grupos, teniendo por un lado cerdas de 1º y 2º parto, con un valor S/P medio de 0,784 (SD=0,317 e IC95% de 0,559 a 1,011) y por otro cerdas con 3 o más partos, con un valor S/P medio de 1,203 (SD=0,438 e IC95% de 1,040 a 1,366), se detectan unos niveles medios significativamente más bajos ($p < 0,01$) de MDA en lechones procedentes de cerdas de primer y segundo parto respecto a los procedentes del resto de paridades.

Tabla 14. Valor S/P medio frente a toxina ApxIII en lechones a las 24 horas agrupados según la paridad de la madre.

Paridad	Media	SD	IC95% (Media valor S/P)	
			inf	sup
1-2	0,784	0,317	0,559	1,011
3-6	1,203	0,438	1,040	1,366

5.4.4. Resultado prueba serológica Apx IV grupo A

En el caso de los anticuerpos maternos frente la toxina ApxIV de *A. pleuropneumoniae*, en primer lugar, hay que tener en consideración que para este kit ELISA el punto de corte establecido por el fabricante como positivo se encuentra en el valor S/P de 0,5, tal y como se ve reflejado en la línea roja en todas las gráficas.

En el caso de los MDA frente a ApxIV, en términos de frecuencia de positivos (valor S/P > 0,5), a las 24 horas de vida solamente se encuentran dos lechones con niveles por debajo del punto de corte, por lo que hay un 95% de lechones positivos, procediendo estos dos animales de la misma cerda. En la semana 10 de vida, aún se detecta un 72,5% de los animales con un nivel de anticuerpos superior al punto de corte, es decir 29 animales positivos.

Tabla 15. Principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones de los niveles de inmunidad materna frente a la toxina ApxIV según la edad.

Edad	24H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Media	1,677	1,594	1,502	1,454	1,383	1,311	1,197	1,061	0,929	0,766	0,660
SD	0,383	0,421	0,444	0,467	0,467	0,451	0,443	0,428	0,416	0,374	0,347
Min	0,336	0,237	0,089	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Max	1,983	1,929	1,881	1,881	1,840	1,791	1,752	1,661	1,648	1,356	1,284
Mediana	1,797	1,706	1,630	1,583	1,495	1,437	1,288	1,162	0,980	0,816	0,682
Positivos	95,0%	92,5%	92,5%	92,5%	92,5%	92,5%	87,5%	87,5%	82,5%	82,5%	72,5%

Al igual que sucede con los anticuerpos maternos frente al resto de toxinas Apx, se observa una reducción del nivel de anticuerpos con la edad ($p < 0,001$), partiendo a las 24 horas de unos niveles más elevados que en el caso de la MDA frente a toxinas ApxI y III, pero más reducidos que para la toxina ApxII, estando en una media en valor S/P de 1,677 (SD=0,383 e IC95% de 1,555 a 1,800), alcanzando a las 10 semanas de edad unos valores medios en valor S/P de 0,660 (SD=0,347 e IC95% de 0,549 a 0,771), estando por tanto a las 10 semanas, de forma parecida a los MDA frente a ApxII, los valores medios por encima del punto de corte de la prueba, llegando a observarse en este caso una

mediana por encima del punto de corte (en el caso de la MDA frente a toxina ApxII, la mediana se localiza por debajo del punto de corte), así como una frecuencia más elevada que en el caso de ApxII. Estas dos últimas características de la distribución de los anticuerpos maternos en la población a las 10 semanas de vida es un reflejo de que un importante número de lechones a esta edad aún presenta anticuerpos maternos frente a la toxina ApxIV.

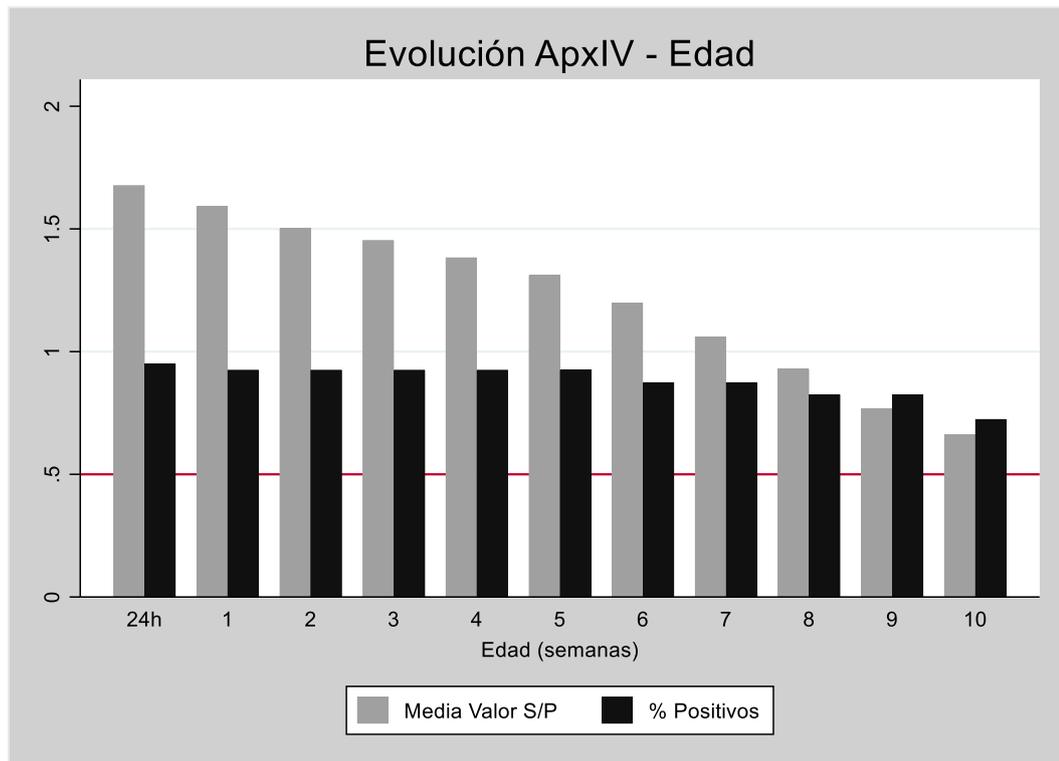


Figura 24. Representación gráfica de la evolución por semanas del nivel medio anticuerpos frente a la toxina ApxIV y del % de positivos detectados por la prueba.

En cuanto a la vida media para los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxIV, según los resultados obtenidos se estima en 57,98 días, más de 8 semanas, lo que supone una gran diferencia respecto a lo que sucede con los MDA frente al resto de toxinas Apx, cuya vida media es más baja.

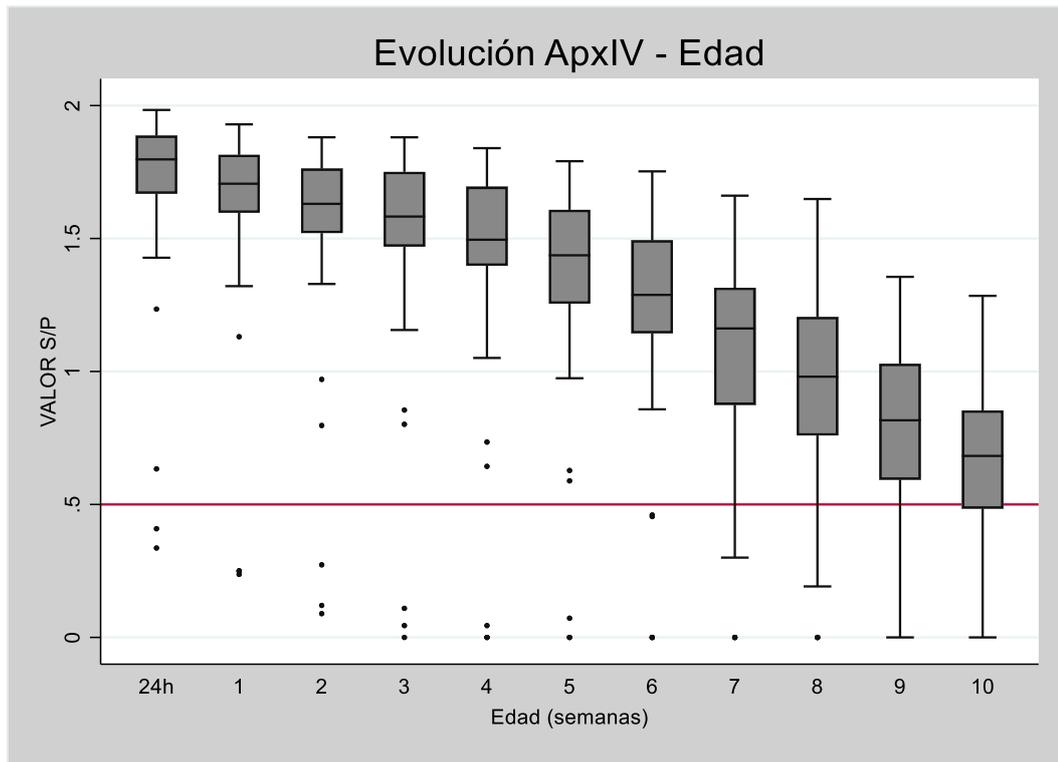


Figura 25. Gráfico de cajas y bigotes con la evolución de los valores S/P frente a la toxina ApxIV de cada individuo agrupados por edad, desde las 24 horas de vida hasta las 10 semanas de vida.

Si bien al igual que sucede con los anticuerpos frente a las toxinas Apx I-III, la edad y el nivel de MDA presente en los lechones están asociados de forma negativa ($p < 0,001$), con un coeficiente de correlación de Spearman (r_s) de $-0,701$ (IC95% de $-0,745$ a $-0,650$).

Mediante un modelo de regresión lineal simple, con estos datos para la ApxIV, con un coeficiente R^2 de $0,363$, se estima un descenso semanal en el nivel de MDA de $0,088$ a $0,113$ (IC95%), medido en valor S/P medio ($p < 0,001$).

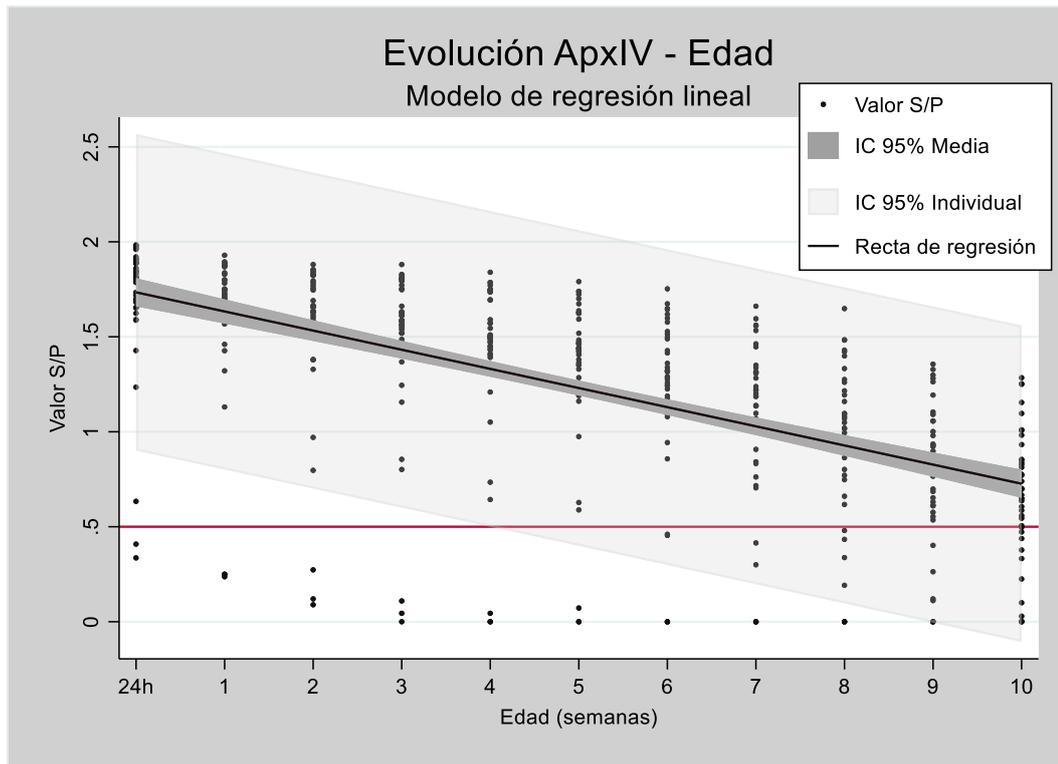


Figura 26. Modelo de regresión lineal con predicción del nivel de anticuerpos frente a la toxina ApxIV (en valor S/P) en función de la edad de los lechones.

En el caso de los anticuerpos frente a la toxina ApxIV, a las 24 horas de vida, no se observan apenas diferencias en el valor S/P que presentan machos y hembras.

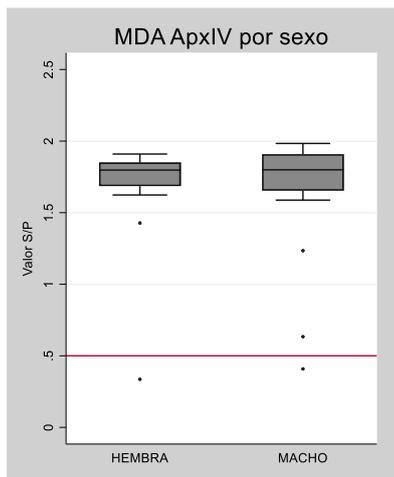


Figura 27. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad materna frente a la toxina ApxIV a las 24 horas según el sexo.

De la misma manera que sucede en los casos anteriores, el nivel de anticuerpos presentes en las madres presenta una asociación significativa con el nivel de MDA presente en los lechones a las 24 horas de vida ($p < 0,001$), estando ambos valores correlacionados de forma positiva con un $r_s = 0,496$ (IC95% de 0,218 a 0,699), estimando mediante un modelo de regresión lineal, con un R^2 de 0,823 que por cada punto que se incrementa el valor S/P en las madres, el nivel de MDA en los lechones a las 24 horas se eleva en un valor S/P de 0,752 a 1,023 (IC95%). Es también remarcable, al igual que sucedía con los MDA frente al resto de toxinas Apx, el hecho de que en algunos lechones el nivel detectado de anticuerpos es incluso superior al de su progenitora, dándose el caso de que la cerda 8370, teniendo un valor S/P negativo a la prueba, dos de sus lechones reflejan un resultado positivo.

Tomando los datos en conjunto, mediante un modelo de regresión múltiple ajustado por la edad en semanas de los lechones y por el valor S/P de la madre el día posterior al parto, se puede determinar que la recta que mejor ajusta a los valores de MDA en los lechones, con un R^2 ajustado de 0,808, viene determinada por la ecuación:

$$\text{valor S/P lechón} = 0,397 + 0,912 * \text{valor S/P madre} - 0,101 * \text{Edad}$$

En este modelo de regresión múltiple ajustado por edad de los lechones y nivel de anticuerpos de sus progenitoras, a diferencia de lo que sucedía con el modelo para el subgrupo ApxI+ con los anticuerpos frente a la toxina ApxI, y con el modelo para la ApxII, si bien hay una influencia muy importante de la edad de los lechones sobre el nivel de MDA, llega a ser más importante el efecto que ejerce el nivel de anticuerpos en las cerdas sobre el nivel de MDA, con un residuo Beta estandarizado más alto.

Respecto a los valores obtenidos intra-camada a las 24 horas de vida, también se detectaron diferencias significativas en los valores S/P obtenidos en función de la cerda de la que provenían los lechones ($p < 0,001$), especialmente marcados en el caso de la camada de la cerda 8370.

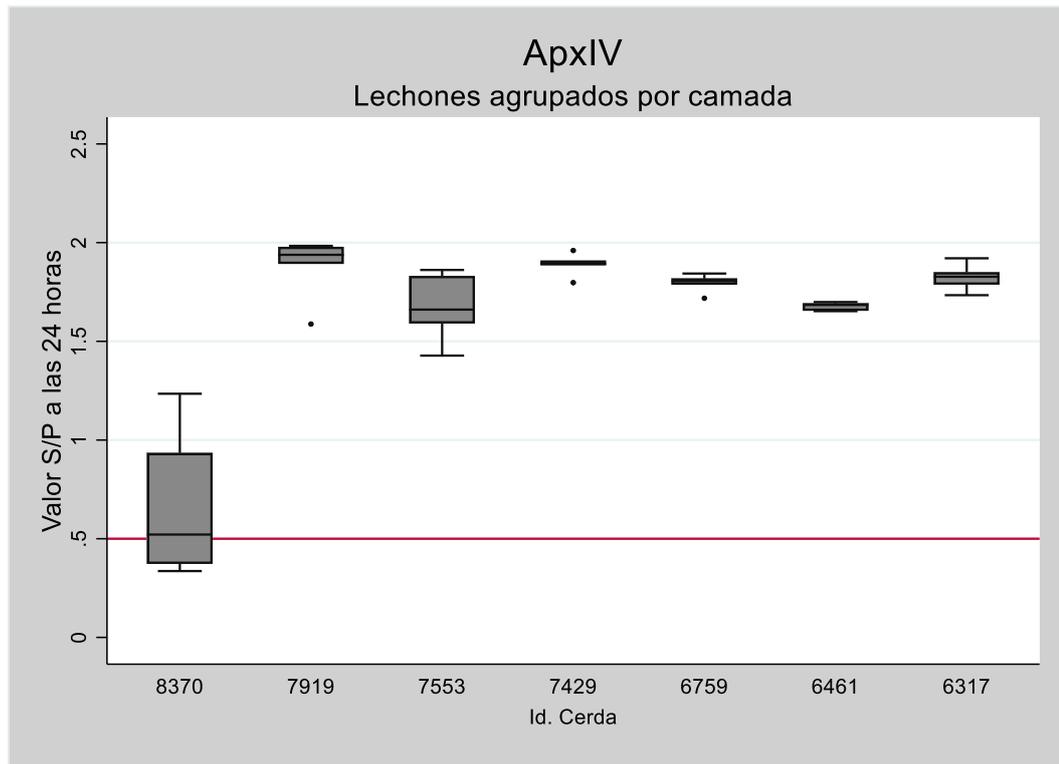


Figura 28. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad maternal frente a la toxina ApxIV a las 24 horas según la camada.

De forma muy parecida a lo que sucedía con los anticuerpos maternos frente a la otras toxinas Apx, si estudiamos los niveles de MDA frente a la ApxIV en función de la paridad de las cerdas, se detectan numéricamente unos niveles medios más bajos de MDA en lechones procedentes de la cerda de primer parto respecto a los procedentes del resto de paridades, de aunque en este caso concreto, y tal y como se observa en el gráfico de cajas y bigotes agrupados por cerdas y ordenados por paridad, no existe correlación significativa de los MDA con la paridad.

5.4.5. Resultado prueba serológica OmpA grupo A

En el caso de los anticuerpos maternos frente la proteína de membrana de *A. pleuropneumoniae*, en primer lugar, hay que tener en consideración que para este kit ELISA el punto de corte establecido por el fabricante como positivo, al igual que para el kit para detección de anticuerpos frente a la toxina ApxIV, se encuentra en el valor S/P de 0,5, tal y como se ve reflejado en la línea roja en todas las gráficas.

En este caso, se observa una reducción en el nivel de MDA con la edad ($p < 0,001$), partiendo de valores S/P medios de 1,173 (SD=0,509 e IC95% de 1,011 a 1,336) a las 24 horas de vida y acabando con valores de 0,155 (SD=0,081 e IC95% de 0,129 a 0,181) a las 10 semanas de vida, viendo como la media del valor S/P pasa a ser inferior al punto de corte establecido como positivo a partir de la tercera semana de vida. La siguiente tabla muestra los estadísticos de centralidad y dispersión en cada uno de los muestreos:

Tabla 16. Principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones de los niveles de inmunidad maternal frente a la proteína OmpA según la edad.

Edad	24H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Media	1,173	0,882	0,609	0,481	0,375	0,297	0,202	0,161	0,156	0,145	0,155
SD	0,509	0,441	0,336	0,273	0,219	0,168	0,116	0,080	0,074	0,069	0,081
Min	0,151	0,150	0,148	0,093	0,080	0,051	0,037	0,034	0,036	0,046	0,048
Max	2,025	1,733	1,275	1,105	0,956	0,748	0,557	0,335	0,354	0,306	0,420
Mediana	1,160	0,808	0,508	0,406	0,328	0,266	0,186	0,147	0,161	0,126	0,119
Positivos	92,5%	77,5%	52,5%	40,0%	22,5%	12,5%	2,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Teniendo en cuenta los datos obtenidos de los 40 animales estudiados, a las 24 horas de vida se detectan 37 lechones (92,5%) con valores positivos, encontrando el último animal positivo en la semana 6, y no encontrando a partir de esta semana animales con valor S/P positivo.

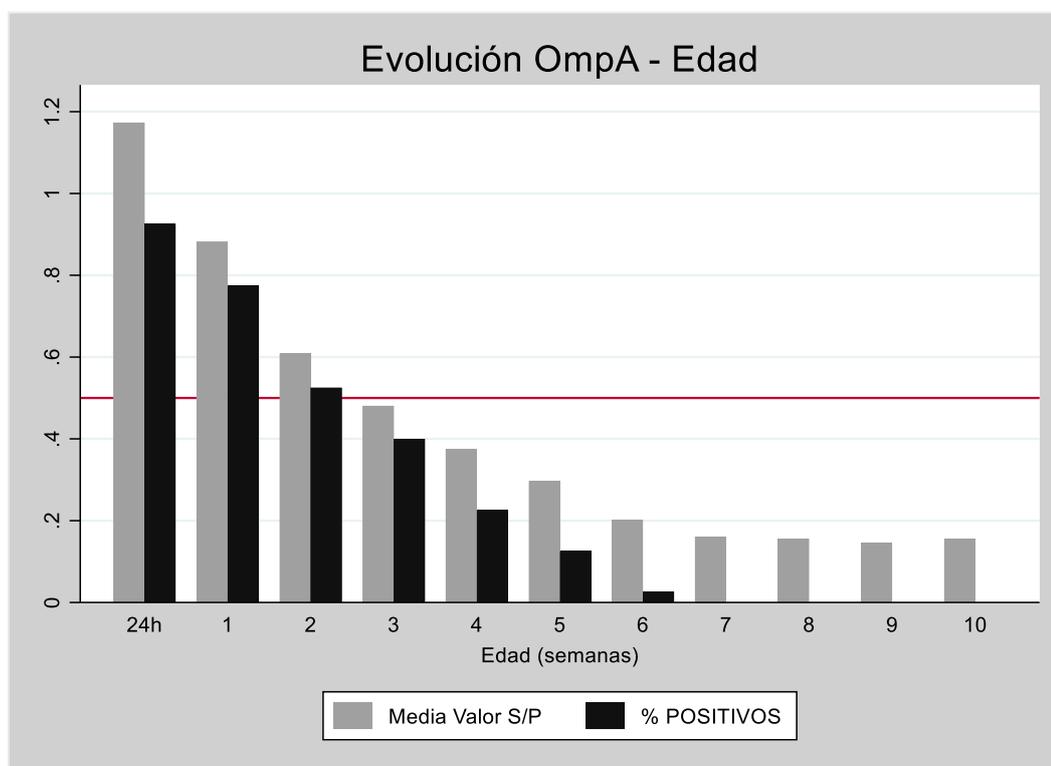


Figura 29. Representación gráfica de la evolución por semanas del nivel medio anticuerpos frente a la proteína OmpA y del % de positivos detectados por la prueba.

En este caso, la vida media para los anticuerpos maternos frente a la proteína de membrana, según los resultados obtenidos se estima en 17,8 días.

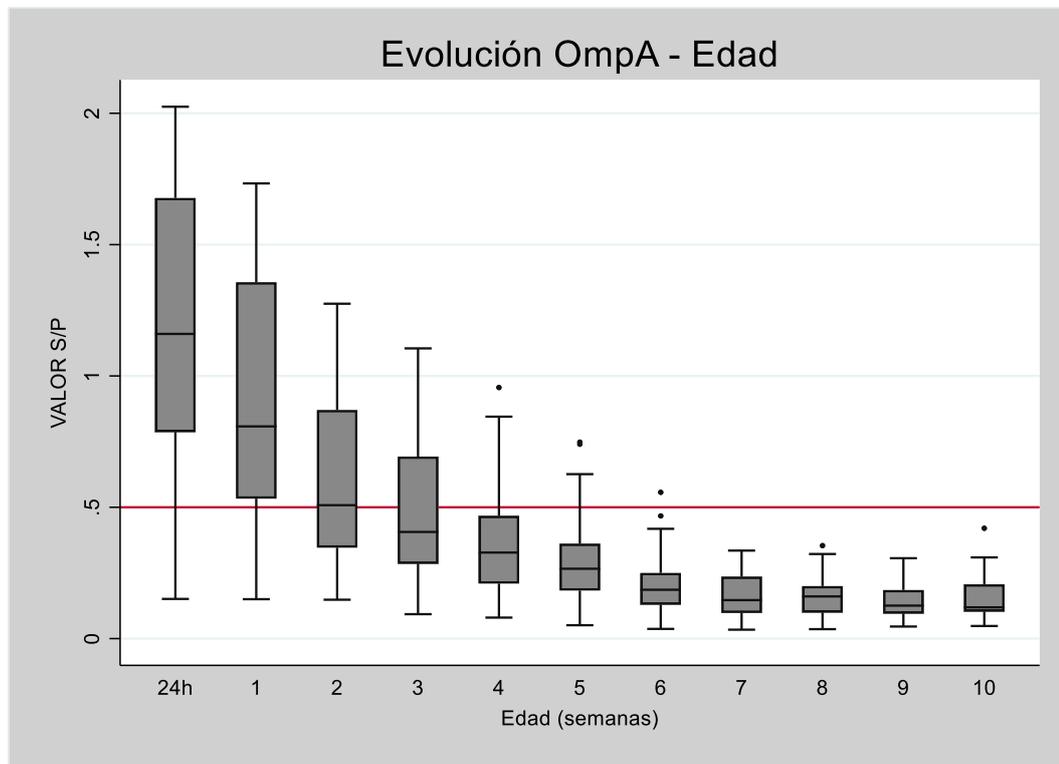


Figura 30. Gráfico de cajas y bigotes con la evolución de los valores S/P frente a la proteína OmpA de cada individuo agrupados por edad, desde las 24 horas de vida hasta las 10 semanas de vida.

Al igual que sucede con los anticuerpos frente las toxinas ApxI-III, la edad y el nivel de MDA presente en los lechones frente a la OmpA están relacionados de forma decreciente ($p < 0,001$), con un coeficiente de correlación de Spearman (r_s) de $-0,756$ (IC95% de $-0,793$ a $-0,712$).

Mediante un modelo de regresión lineal simple, con estos datos para la OmpA, con un coeficiente R^2 de $0,498$, se observa un descenso semanal en el nivel de MDA de $0,084$ a $0,102$ (IC95%), medido en valor S/P medio ($p < 0,001$).

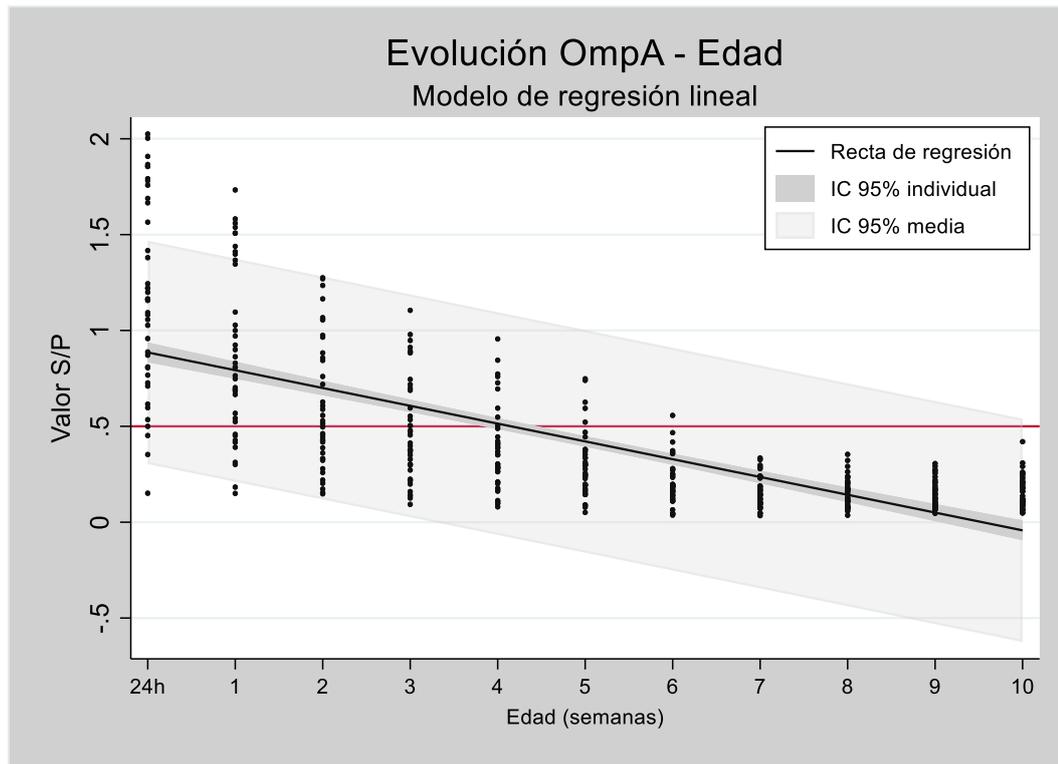


Figura 31. Modelo de regresión lineal con predicción del nivel de anticuerpos frente a la proteína OmpA (en valor S/P) en función de la edad de los lechones.

En el caso de los anticuerpos frente a la OmpA, a las 24 horas de vida, no se observan diferencias en el valor S/P que presentan machos y hembras.

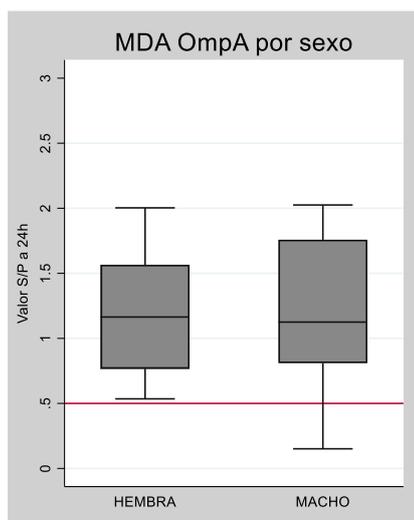


Figura 32. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad materna frente a la proteína OmpA a las 24 horas según el sexo.

De la misma manera que sucede en los casos anteriores, el nivel de anticuerpos presentes en las madres presenta una asociación significativa con el nivel de MDA presente en los lechones a las 24 horas de vida ($p < 0,001$), estando ambos valores relacionados de forma creciente con un $r_s = 0,833$ (IC95% de 0,704 a 0,909), estimando mediante un modelo de regresión lineal, con un R^2 de 0,560 que por cada punto que se incrementa el valor S/P en las madres, el nivel de MDA en los lechones a las 24 horas se eleva en un valor S/P de 1,031 a 1,878 (IC95%). Al igual que en el resto de los casos, se repite nuevamente la tónica de que en algunos lechones el nivel detectado de anticuerpos es superior al de su progenitora.

Tomando los datos en conjunto, mediante un modelo de regresión múltiple ajustado por la edad en semanas de los lechones y por el valor S/P de la madre el día posterior al parto, se puede establecer que la recta que mejor ajusta a los valores de MDA en los lechones, con un R^2 ajustado de 0,597, viene determinada por la ecuación:

$$\text{valor S/P lechón} = 0,293 + 0,51 * \text{valor S/P madre} - 0,093 * \text{Edad}$$

En este modelo de regresión múltiple ajustado por edad de los lechones y nivel de anticuerpos de sus progenitoras, al igual que sucedía con el modelo para el subgrupo ApxI+ con los anticuerpos frente a la toxina ApxI, y con los modelos para la ApxII y ApxIII, si bien hay una influencia muy importante del nivel de anticuerpos en las cerdas sobre el nivel de MDA, es más importante el efecto que ejerce la edad de los lechones sobre el nivel de MDA, con un residuo Beta estandarizado más alto.

No obstante, al igual que sucede con los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxI y ApxIII, el modelo de regresión que mejor ajusta a los datos obtenidos, con un R^2 ajustado de 0,760, se obtiene mediante un modelo polinómico fraccional multivariable, tal y como se puede observar en el siguiente gráfico:

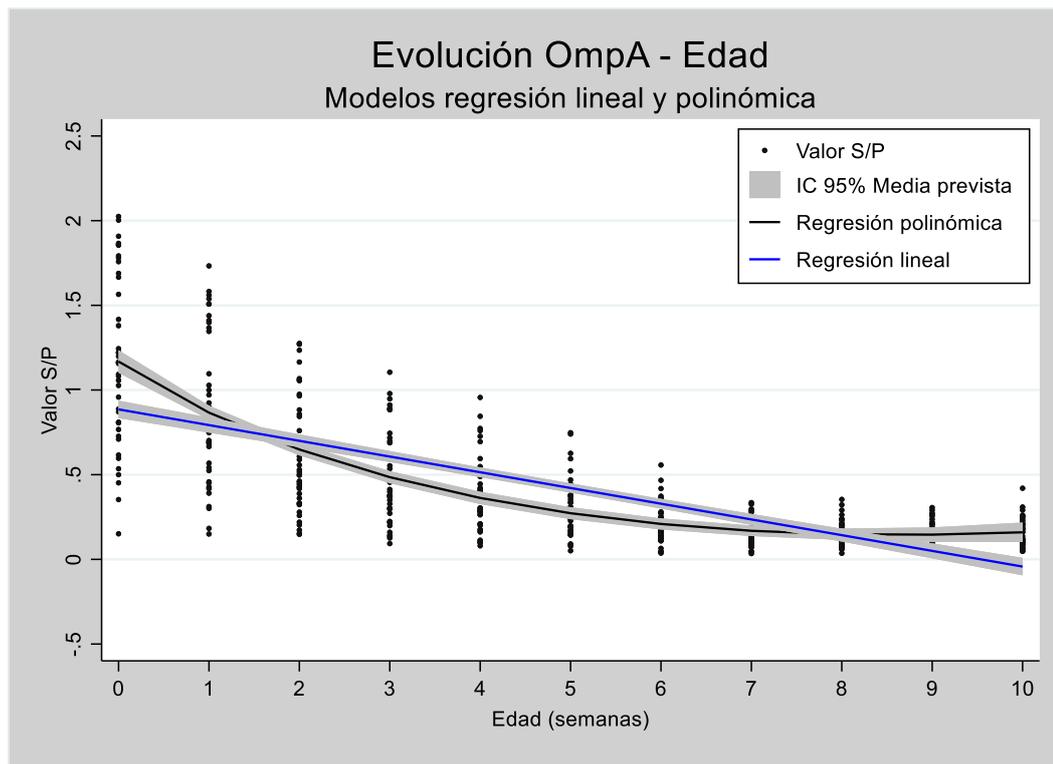


Figura 33. Modelos de regresión lineal y polinómico fraccional con predicción del nivel de anticuerpos frente a la proteína OmpA (en valor S/P) en función de la edad de los lechones.

Respecto a los valores obtenidos intra-camada a las 24 horas, en este caso al igual que sucede con los anticuerpos maternos frente a las toxinas Apx, se detectan diferencias significativas en los valores S/P obtenidos, en función de la cerda de la que provengan los lechones ($p < 0,001$), así como también se observan diferencias en la amplitud del intervalo intercuartílico del valor S/P entre las diferentes camadas, con bastante dispersión de los datos, a diferencia de la prueba frente a la toxina ApxIV; no detectando en este caso homogeneidad entre las varianzas de las diferentes camadas mediante la prueba de Levene.

Por otro lado, no se detecta correlación entre la paridad y el valor S/P de los lechones a las 24 horas, así como cuando los lechones se agrupan en dos clústeres según paridad, separando las dos primeras paridades del resto, no se observan diferencias significativas entre grupos. Así pues, estos resultados sugieren que el tiempo permanecido en la granja no afecta al valor S/P de los lechones, al igual que sucedía en el caso de los MDA frente a las toxinas ApxII y ApxIV.

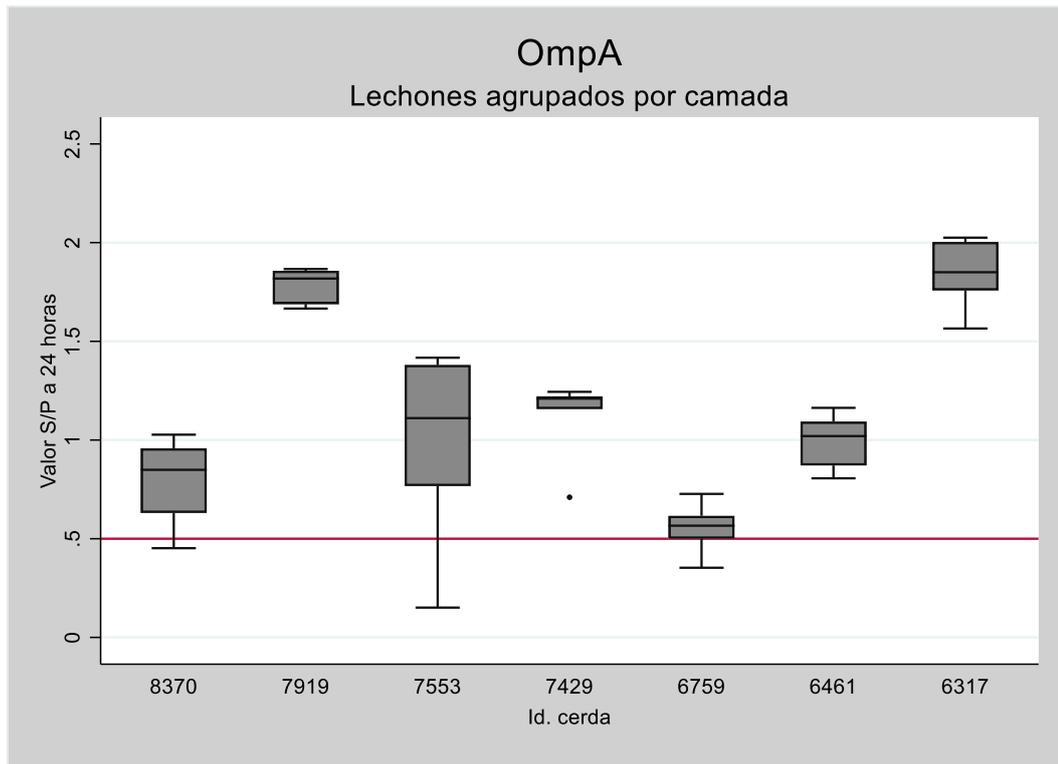


Figura 34. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de inmunidad materna frente a la proteína OmpA a las 24 horas según la camada.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con todas las pruebas, se puede asumir de que de forma generalizada, los niveles de anticuerpos maternos están en todos los casos asociados a los niveles de anticuerpos de las madres en el momento del parto, pudiendo jugar la paridad de la cerda, o lo que es lo mismo, el tiempo que la cerda ha permanecido en la granja un papel relevante, posiblemente debido a que este mayor tiempo en la granja ha dado lugar a una mayor posibilidad de contacto con *A. pleuropneumoniae* o con otras bacterias productoras de estos antígenos, si bien esto no se ha observado con todas las pruebas por igual. Además, en la mayor parte de los casos se observa disparidad de los niveles de anticuerpos dentro de la camada, posiblemente asociado a la cantidad de calostro ingerida por cada animal en particular. También se observa de forma generalizada que la duración de los anticuerpos maternos depende tanto de los niveles iniciales, como de la edad transcurrida, una duración que podemos ver en la tabla 17, donde se pueden apreciar importantes diferencias en lo que respecta a la vida media de los anticuerpos frente a los distintos antígenos evaluados.

Tabla 17. Vida media de los anticuerpos maternos frente a diferentes antígenos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Vida media (en días)	
ApxI	9,56
ApxII	35,49
ApxIII	11,79
ApxIV	57,98
OMP	17,8

5.5. Resultados pruebas serológicas ApxI, II, III, IV y OmpA a las 18 semanas grupo A

En primer lugar, es necesario puntualizar que, a las 18 semanas de vida, de los 42 animales seleccionados, únicamente quedaban con vida 37 animales. A las 2 bajas que se produjeron en la primera fase del estudio, se añadieron las bajas de los lechones 2, 3 y 13, que causaron baja por mortalidad entre las semanas 10 y 18 de vida.

Tabla 18. Principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones de los niveles de anticuerpos detectados en la semana 18 de vida en el grupo A, y prevalencia de positivos con todas las pruebas.

	Valor S/P ApxI	Valor S/P ApxII	Valor S/P ApxIII	Valor S/P ApxIV	Valor S/P OmpA
Media	0,002	0,095	0,038	0,115	0,231
SD	0,007	0,143	0,056	0,126	0,164
Min	0,000	0,000	0,000	0,000	0,030
Max	0,029	0,592	0,253	0,444	0,820
Mediana	0,000	0,030	0,021	0,087	0,173
Positivos	0,00%	8,11%	0,00%	0,00%	10,81%

Así pues, en el caso de las pruebas serológicas realizadas a los animales del grupo A a las 18 semanas de vida, las pruebas ELISA para detección de anticuerpos frente a las toxinas ApxI, ApxIII y Apx IV no detectaron ningún animal positivo, si bien 3 animales dieron un resultado dudoso (aunque por debajo del punto de corte) con la prueba ApxIV, siendo además animales que a las 10 semanas de vida aún presentaban unos niveles elevados de anticuerpos maternos (animales 14, 15 y 16), lo que hace presuponer que estos valores podrían deberse a inmunidad maternal, dado que los animales no presenten anticuerpos frente al resto de toxinas Apx ni frente a la OmpA.

Con la prueba ELISA frente a ApxII, se detectaron 3 animales positivos (8,11%) y con el kit ELISA frente a la proteína OmpA, se detectaron 4 animales positivos (10.81%), siendo remarcable que los 3 animales detectados como positivos para ApxII, los 4 detectados como positivos para la OmpA y los 3 dudosos para la ApxIV eran animales diferentes; y todos los animales que dieron resultado positivo ofrecieron un valor S/P relativamente bajo y cercano al punto de corte de las diferentes pruebas.

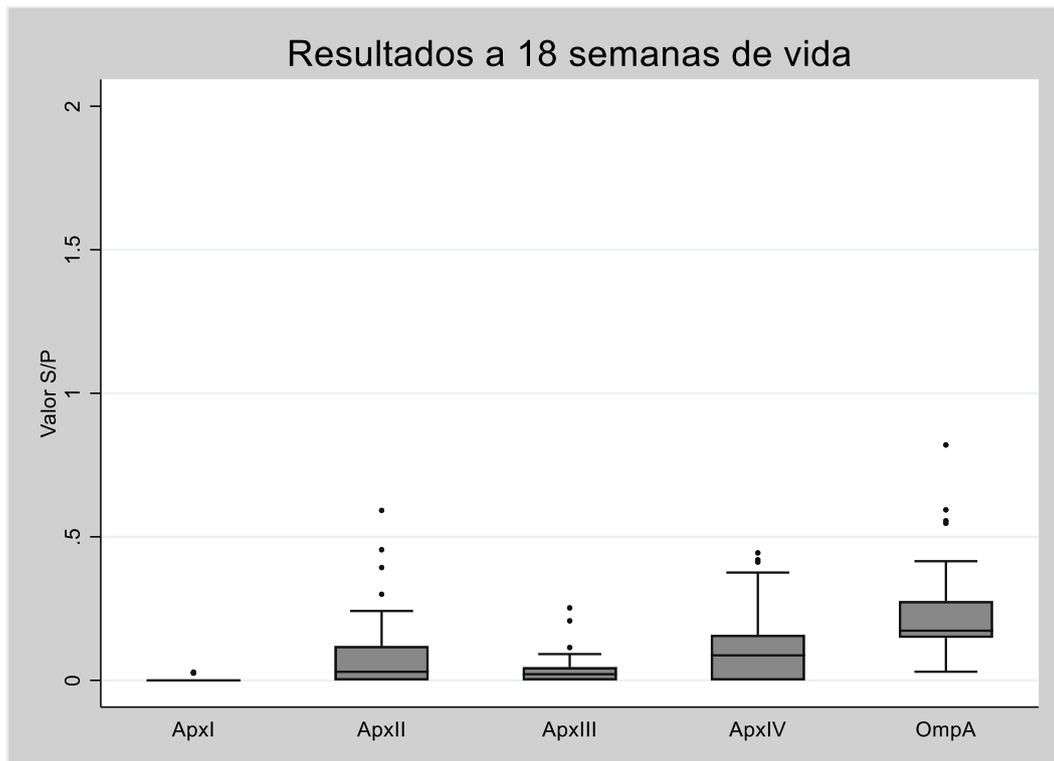


Figura 35. Gráfico de cajas y bigotes con los valores S/P de cada individuo en la semana 18ª frente a todos los antígenos estudiados.

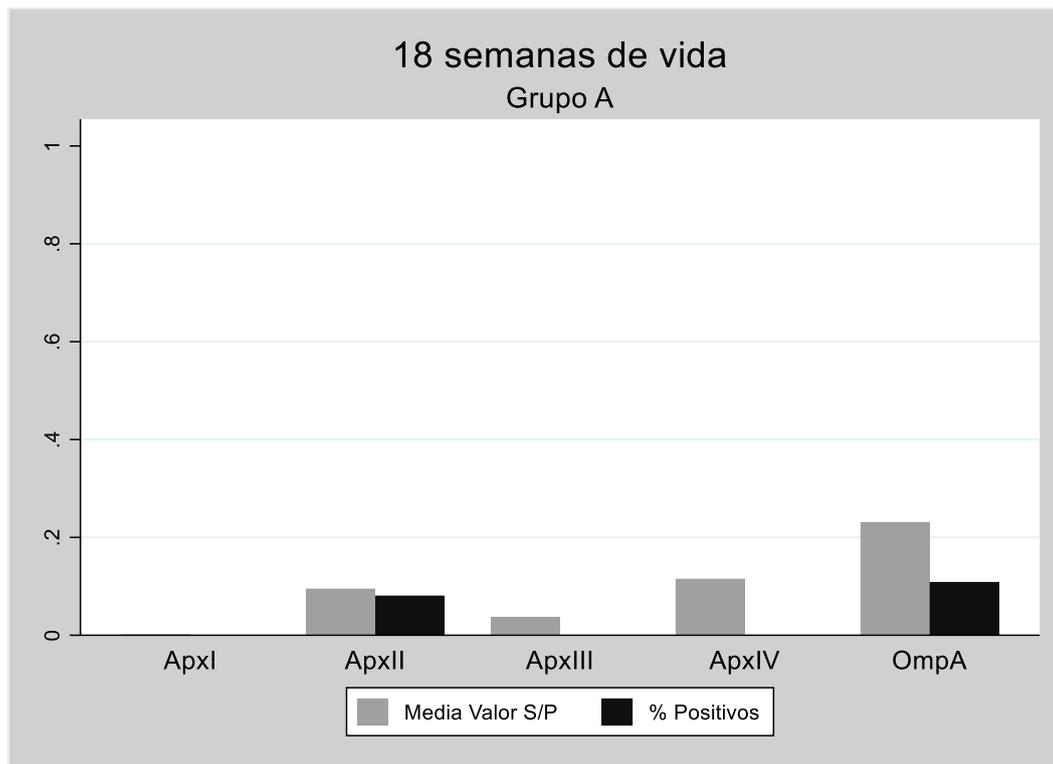


Figura 36. Representación gráfica del nivel medio anticuerpos y del % de positivos detectados por las diferentes pruebas en la semana 18ª.

5.6. Resultados serológicos lechones Grupo B

Del grupo B, no se pudo localizar al animal 2, y los animales 8 y 11 causaron baja por mortalidad, por lo que el grupo finalmente quedó conformado por 39 lechones.

En grupo B, procedente de una granja negativa a *A. pleuropneumoniae*, no se detectaron animales con anticuerpos frente a las toxina ApxI y ApxIV, frente a la proteína de membrana (OmpA) tampoco se detectaron animales positivos, si bien se detectaron dos animales con un valor S/P entre 0,3 y 0,4; valores por debajo del punto de corte (lechones 31 y 14) y, frente a la toxina ApxIII únicamente se detectó un animal con resultado positivo a la 10ª semana de vida, si bien el valor S/P obtenido era de 0,467, cercano al punto de corte.

La situación con los anticuerpos frente a la toxina ApxII se manifestó de forma diferente al resto, por lo que merece un análisis más detallado, encontrando un 51,3% de los animales positivos a la 4ª semana de vida, presentando unos valores S/P medios de 0,416 (SD=0,579 e IC95% de 0,229 a 0,604), siendo también un 51,3% positivos a la 10ª semana de vida, con unos valores S/P medios de 0,596 (SD=0,712 e IC95% de 0,365 a 0,827).

Tabla 19. Prevalencia y principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones obtenidos en el grupo B frente a las toxinas ApxI-IV y proteína OmpA a la 4ª y 10ª semana de edad.

Edad	Valor S/P ApxI		Valor S/P ApxII		Valor S/P ApxIII		Valor S/P ApxIV		Valor S/P OmpA	
	S4	S10	S4	S10	S4	S10	S4	S10	S4	S10
Media	0,000	0,011	0,416	0,596	0,007	0,038	0,002	0,011	0,142	0,147
SD	0,000	0,033	0,579	0,712	0,019	0,081	0,012	0,040	0,083	0,075
Min	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,035	0,043
Max	0,000	0,164	3,210	3,009	0,081	0,467	0,077	0,175	0,345	0,392
Mediana	0,000	0,000	0,307	0,324	0,000	0,000	0,000	0,000	0,113	0,133
Positivos	0,0%	0,0%	51,3%	51,3%	0,0%	2,56%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

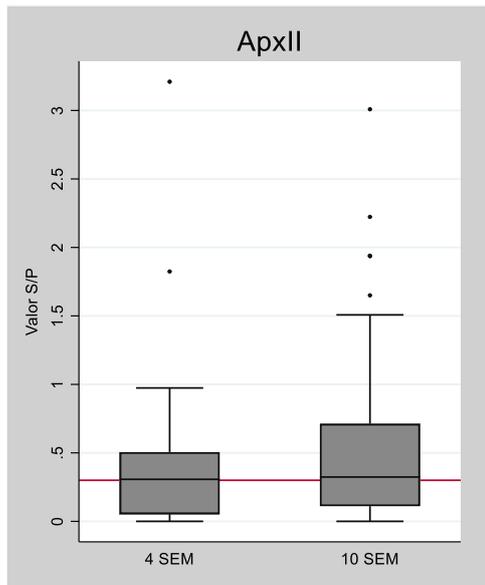


Figura 37. Gráfico de cajas y bigotes con el nivel de anticuerpos frente a la toxina ApxII detectado en los animales del grupo B a la 4ª y la 10ª semana de edad.

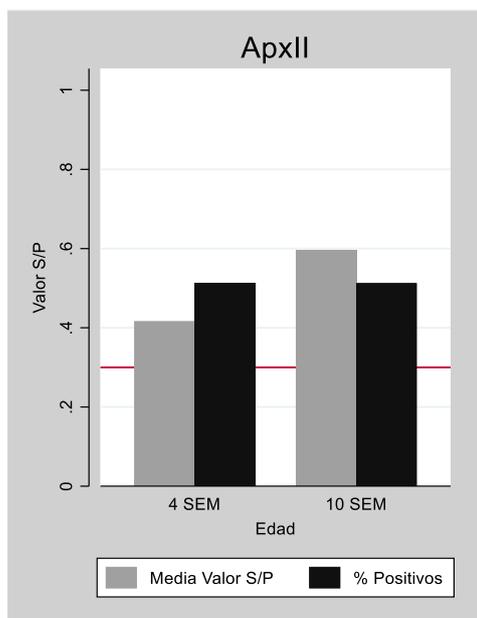


Figura 38. Representación gráfica de la evolución por semanas del nivel medio anticuerpos frente a la toxina ApxII y del % de positivos detectados por la prueba a la 4ª y la 10ª semana de edad en el grupo B.

Si comparamos estos resultados frente a la toxina ApxII con los obtenidos a las mismas edades en el grupo A, a la 4ª semana de edad se observa que los valores S/P son más elevados en el grupo A ($p < 0,001$), así como la prevalencia de animales positivos ($p < 0,001$). Sin embargo, a la 10ª semana de vida sucede a la inversa, los valores S/P son más elevados en el grupo B, sin que la diferencia llegue a ser estadísticamente significativa, aunque marcando una tendencia ($p = 0,097$); así como también la prevalencia de animales positivos, sin llegar a ser esta última diferencia estadísticamente significativa. Esto podría constituir un indicativo de que la tendencia a la baja que se observa en el grupo A se debe a la dinámica de los anticuerpos maternos, y la tendencia al alza en el grupo B podría deberse a una infección activa por una bacteria productora de toxina ApxII, como podría ser *Actinobacillus porcitonisillarum* o *Actinobacillus rossii*, ya que la ausencia de anticuerpos frente a ApxIV y OmpA descarta la implicación de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y la ausencia de anticuerpos frente a ApxI también descartaría la presencia de *Actinobacillus suis*.

Tabla 20. Principales estadísticos en base a momentos y ordenaciones obtenidos en los grupos A y B frente a la toxina ApxII a la 4ª y 10ª semana de edad.

ApxII	GRUPO A		GRUPO B	
	4 SEM	10 SEM	4 SEM	10 SEM
Edad				
Media	1,801	0,383	0,416	0,596
SD	1,175	0,361	0,579	0,712
Min	0,366	0,000	0,000	0,000
Max	3,934	1,432	3,210	3,009
Mediana	1,424	0,244	0,307	0,324
Positivos	100%	42,5%	51,3%	51,3%

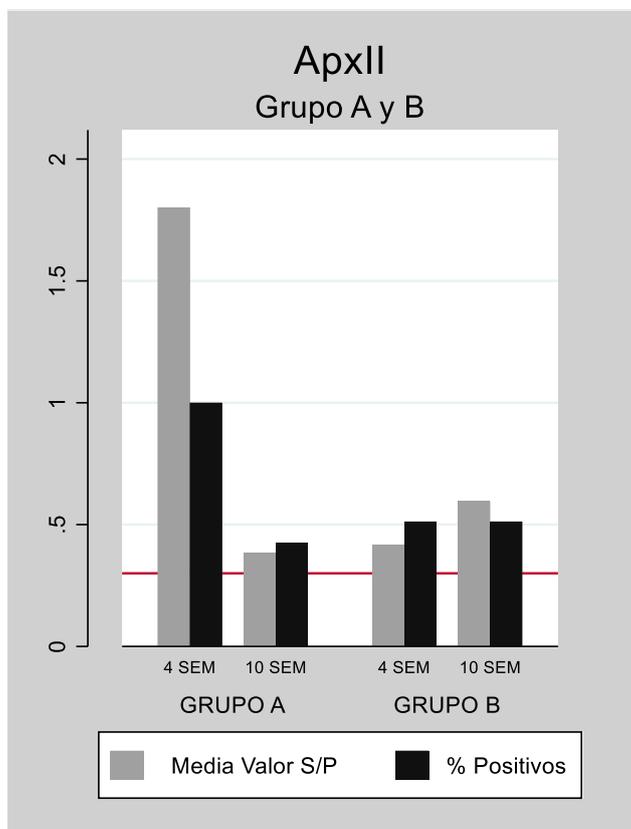


Figura 39. Representación gráfica de la evolución por semanas del nivel medio anticuerpos frente a la toxina ApxI y del % de positivos detectados por la prueba a la 4ª y a la 10ª semana de edad en los grupos A y B.

5.7. Estudio la concordancia entre las 5 pruebas de ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de positivos a *A. pleuropneumoniae* mediante la detección de anticuerpos frente a las toxinas ApxI-III, ApxIV y la proteína OmpA.

Para la evaluación de la concordancia entre las cinco pruebas ELISA, respecto a su capacidad de detectar animales positivos o negativos a *A. pleuropneumoniae*, se han tenido en cuenta los resultados del grupo B (granja negativa) y los resultados a la 18ª semana de vida en la granja A, siendo ambas, poblaciones en las que la prevalencia de animales negativos es muy alta, y la de positivos muy baja o inexistente, una importante limitación que se ha de tener en cuenta para la interpretación de los resultados.

Tabla 21. Animales detectados como positivos y negativos por cada una de las pruebas en la granja B (negativa).

	ApxI	ApxII	ApxIII	ApxIV	OmpA
Positivos	0	43	1	0	4
Negativos	115	72	114	115	111
Total	115	115	115	115	115

Por este motivo, el grado de validez de esta evaluación de concordancia para la detección de animales enfermos o positivos es reducida, tal y como se puede observar en la tabla 22, con un bajo acuerdo entre las cinco pruebas para la detección de animales positivos.

Tabla 22. Acuerdo específico para positivos entre las 5 pruebas ELISA evaluadas.

ACUERDO ESPECIFICO PARA POSITIVOS					
ApxI		0,0%	0,0%	NE	0,0%
ApxII	0,0%		4,6%	0,0%	4,3%
ApxIII	0,0%	4,6%		0,0%	0,0%
ApxIV	NE	0,0%	0,0%		0,0%
OmpA	0,0%	4,3%	0,0%	0,0%	
	ApxI	ApxII	ApxIII	ApxIV	OmpA

Sin embargo, para la detección de animales negativos, se observa una elevada concordancia, tal y como se puede observar en la tabla 23, con un elevado grado de acuerdo, especialmente entre las pruebas ELISA frente a las toxinas ApxI, ApxIII, ApxIV y la proteína OmpA.

Tabla 23. Acuerdo específico para negativos entre las 5 pruebas ELISA evaluadas.

ACUERDO ESPECIFICO PARA NEGATIVOS					
ApxI		77,0%	99,6%	100,0%	98,2%
ApxII	77,0%		77,4%	77,0%	75,4%
ApxIII	99,6%	77,4%		99,6%	97,8%
ApxIV	100,0%	77,0%	99,6%		98,2%
OmpA	98,2%	75,4%	97,8%	98,2%	
	ApxI	ApxII	ApxIII	ApxIV	OmpA

Tabla 24. Índice kappa de concordancia entre las 5 pruebas ELISA evaluadas.

INDICE kappa					
ApxI		0,000	0,000	NE	0,000
ApxII	0,000		0,029	0,000	-0,025
ApxIII	0,000	0,029		0,000	-0,041
ApxIV	NE	0,000	0,000		0,000
OmpA	0,000	-0,025	-0,041	0,000	
	ApxI	ApxII	ApxIII	ApxIV	OmpA

Tabla 25. Índice PABAK (índice kappa ajustado por sesgo y prevalencia) de concordancia entre las 5 pruebas ELISA evaluadas.

INDICE PABAK					
ApxI		0,252	0,983	NE	0,930
ApxII	0,252		0,270	0,252	0,217
ApxIII	0,983	0,270		0,983	0,913
ApxIV	NE	0,252	0,983		0,930
OmpA	0,930	0,217	0,913	0,930	
	ApxI	ApxII	ApxIII	ApxIV	OmpA

Tal y como se puede observar en la tabla 25, con el índice kappa ajustado por sesgo y prevalencia (PABAK) de la muestra estudiada, la prueba que presenta un menor grado de concordancia con el resto es la prueba ELISA frente a la toxina ApxII, presentando todas las demás un excelente grado de concordancia entre ellas, según la escala de Altman.

6. DISCUSIÓN

El estudio de evolución de los anticuerpos maternos frente a las toxinas Apx y la proteína OmpA de *A. pleuropneumoniae* realizado en el presente trabajo, sugiere que la duración de estos puede llegar a ser muy diferente en función del antígeno de que se trate (tabla 17). Debemos tener en cuenta que el mejor método para la comparación entre diferentes trabajos en referencia a la duración de los anticuerpos maternos es el estudio de su vida media (Martínez-Boixaderas et al., 2022). Así, se puede observar en el trabajo de Vigre et al. (2003), en el que se estudió la evolución de los anticuerpos maternos específicos frente al LPS del serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae* mediante ELISA, la detección de una duración media de estos anticuerpos maternos de 2 semanas (11-15 días), similar a la detectada en el presente trabajo frente a las toxinas ApxI (9,56 días), ApxIII (11,79 días), y la proteína OmpA (17,8 días).

Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Cruijisen et al. (1995c), focalizado en la duración de los anticuerpos maternos neutralizantes frente a toxinas Apx, encontró una vida media de estos anticuerpos de 4 a 6 semanas, resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio frente a las toxinas ApxII (5 semanas) y ApxIV (8 semanas). Si bien cabe mencionar que el trabajo de Cruijisen et al. (1995c) se llevó a cabo mediante seroneutralización, midiendo la capacidad del suero de los lechones para neutralizar la actividad citotóxica y hemolítica de *A. pleuropneumoniae*, y teniendo en cuenta que, tanto la toxina ApxI como la ApxIII presentan actividad citotóxica y tanto la ApxI como la ApxII presentan actividad hemolítica (Frey et al., 1993), existe la posibilidad de que se detectasen reacciones cruzadas entre anticuerpos frente a las toxinas ApxI, II y III, y aquellos anticuerpos específicos frente a la toxina que se presentasen en mayor cantidad indujesen a establecer una duración más prolongada para el resto.

Además, hay que tener en cuenta, tal y como observan algunos autores, que existe una homología entre toxinas ApxI y II de un 50%, y entre toxina ApxII y ApxIII de un 40% (Jung et al., 2019; Shin et al., 2011), lo que da lugar a la reacción serológica cruzada entre anticuerpos frente a las toxinas ApxI-III observada por diversos estudios (Giménez-Lirola et al., 2014; Jung et al., 2019; Nielsen et al., 2000), por lo que se recomienda realizar los estudios serológicos mediante el uso de proteínas Apx recombinantes en lugar de proteínas purificadas, seleccionando aquellas estructuras de la toxina que generan una menor reacción cruzada con el resto de toxinas (Jung et al., 2019).

Los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxII parecen tener una mayor duración que los dirigidos frente a las toxinas ApxI y ApxIII, siendo unos resultados muy similares a los observados por otros autores (Jirawattanapong et al., 2008; Shin et al., 2011; Tumamao et al., 2004a). Así,

Jirawattanapong et al. (2008), aunque no establece la vida media de los anticuerpos maternos frente a las toxinas ApxI-IV, sí que evalúa hasta qué edad se detectan los anticuerpos, hallando unos niveles más elevados a la 6ª semana de vida frente a la toxina ApxII que frente a las toxinas ApxI y ApxIII, y que estos anticuerpos frente a ApxII pueden ser aún detectados hasta la semana 10ª de vida. Igualmente, observan una mayor duración de los anticuerpos frente a la toxina ApxIV, pudiendo llegar hasta la semana 14ª, lo que viene a refutar la observación del presente estudio con una mayor duración de los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxIV respecto al resto. Cabe reseñar en este punto, que a pesar de observarse una mayor duración por diversos estudios de la inmunidad materna frente a las toxinas ApxII y ApxIV, su estructura antigénica no está relacionada, lo que implica que no hay posibilidad de reacciones cruzadas entre ellas (Schaller et al., 1999). La mayor duración de la inmunidad materna frente a estas dos toxinas podría estar relacionada con una mayor exposición de las cerdas a las mismas, ya que la toxina ApxIV es producida por todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae*. Una exposición a cualquier serotipo implicaría contacto con la toxina, y por otro lado la toxina ApxII es producida por otras bacterias comúnmente habituales en la microbiota bacteriana tonsilar del cerdo (Frey, 2019), lo que también podría llevar a un contacto continuado con este antígeno. De igual modo, estos resultados podrían estar también relacionados con los resultados revelados por el estudio de Stancheva et al. (2022), en el que las proteínas ApxIIA, ApxIIIA y ApxIVA parecen ser las más abundantes en el exoproteoma de *A. pleuropneumoniae*, llevando a un mayor contacto con estos antígenos por parte de los animales infectados. Sin embargo, otros autores han detectado un mayor nivel de los anticuerpos maternos frente a las toxinas ApxI y ApxIII que frente a ApxII, siendo los niveles elevados a la 4ª semana, y bajos a las 8ª y a la 12ª (Chiers et al., 2002a). Este estudio, al igual que el de Crujisen et al. (1995c), se llevó a cabo mediante seroneutralización, por lo que se pudieron detectar reacciones cruzadas entre toxinas, además, en este caso no se evaluaron los anticuerpos frente a la toxina ApxIV. Por otro lado, los estudios de Vigre et al. (2003) y Krejci et al. (2005), realizados mediante ELISA frente al serotipo 2, detectan una duración máxima de estos anticuerpos de 8 semanas, con lo que teniendo en cuenta que en este trabajo hemos detectado anticuerpos frente a las toxinas ApxII y ApxIV en un elevado porcentaje de animales aún a la semana 10ª, siendo este el último punto de muestreo, sugiere una mayor duración de los anticuerpos frente a las toxinas Apx, que frente a otras estructuras de la bacteria como los LPS o las proteínas Omp.

En cualquier caso, todos estos resultados confirman que la duración de los anticuerpos maternos puede ser diferente en función del antígeno frente a la que vayan dirigidos, con lo que no tiene sentido establecer que la duración de los anticuerpos maternos frente a la toxina

ApxIV marca la duración de los anticuerpos maternos frente a las toxinas ApxI-III, lo que es un hallazgo muy relevante, teniendo en cuenta que muchas vacunas disponibles hoy en día frente a *A. pleuropneumoniae* están diseñadas en base a las toxinas (Gottschalk & Broes, 2019; Loera-Muro & Angulo, 2018). Tal y como reportan algunos autores, se pueden dar fenómenos de interacción de estas vacunas con la inmunidad materna frente a las toxinas ApxI-III que esté presente en los animales en el momento de la vacunación (Jirawattanapong et al., 2008), con lo que una práctica comúnmente establecida es medir esta inmunidad materna en base a los anticuerpos frente a la toxina ApxIV, dado que no hay kits comerciales disponibles frente a las toxinas ApxI-III, asumiendo que la dinámica de anticuerpos es parecida para todas las toxinas Apx y así buscar la ventana vacunal más oportuna para aplicar las vacunas. Así pues, los resultados del presente estudio ponen en entredicho esta práctica, dado que la duración de los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxIV parece ser, al menos bajo las condiciones de este estudio, sustancialmente más elevada que frente al resto de las toxinas, por lo que la duración de los anticuerpos frente a las toxinas ApxI-III de cara a evitar la interferencia vacunal, debería ser realizada mediante técnicas específicas para medir los anticuerpos frente a cada una de las toxinas.

Los niveles iniciales de anticuerpos maternos en el lechón frente a las diferentes estructuras antigénicas de *A. pleuropneumoniae* que hemos estudiado, están asociados a los niveles de anticuerpos que presentan las madres, con una elevada correlación entre ambos. Este es un hecho que también observan otros estudios, que si bien se llevan a cabo midiendo los anticuerpos maternos frente al LPS del serotipo 2 de *A. pleuropneumoniae*, detectan la misma asociación (Sjölund et al., 2011b; Vigre et al., 2003), encontrando, al igual que en el presente trabajo, por un lado una importante variabilidad entre camadas, que está asociada al nivel de anticuerpos que posee la progenitora y a la variabilidad que hay entre cerdas, tal y como también observan Vigre et al. (2003). Por otro lado, hemos observado una importante variabilidad entre lechones dentro de la misma camada al igual que se documenta en los trabajos de Vigre et al. (2003) y Nechvatalova et al. (2005), los cuales sugieren que estas diferencias se deben a la cantidad de calostro ingerido y al tiempo de encalostramiento. De hecho, Curtis & Bourne (1971) indican que la variabilidad entre lechones de una misma camada en el nivel de anticuerpos maternos puede ser debida a los diversos factores que influyen en la ingesta de calostro como el comportamiento de los lechones durante el encalostramiento, el orden de nacimiento y las diferencias en la producción de calostro entre tetas. Cabe mencionar que en el trabajo de Sjölund et al. (2011b) no se detectó que el nivel de anticuerpos maternos

estuviese asociado con el peso al nacimiento, variable que en el presente estudio se ha evaluado.

No obstante, a diferencia del resto de estudios, probablemente porque estos han sido llevados a cabo determinando el nivel de anticuerpos frente a un único antígeno, la variabilidad observada en nuestro estudio no ha sido igual para todos los antígenos evaluados. Se ha observado una variabilidad más reducida entre lechones de la misma camada, así como entre camadas en el caso de los anticuerpos maternos frente a la toxina ApxIV, así como una variabilidad más reducida entre lechones de la misma camada en el caso de la proteína OmpA. Este efecto podría ser debido a una mayor variabilidad entre resultados con las pruebas ELISA ApxI-III, aunque sería necesario realizar estudios adicionales para confirmar y encontrar las posibles causas de este hallazgo.

A pesar de que el presente estudio no estaba enfocado a determinar la relación entre la paridad de las cerdas con los niveles de anticuerpos tanto en cerdas como en lechones, los resultados obtenidos sugieren que podría existir esta asociación. Si bien no sería la misma para todos los antígenos estudiados, tal y como se observa en los anticuerpos maternos frente a todas las toxinas Apx, en las que se detectan unos mayores niveles de anticuerpos a medida que la paridad es mayor. Esto, en cierta medida, coincide con algunas observaciones realizadas por Tobias et al. (2014b), que evaluaron los anticuerpos en las cerdas frente a las toxinas Apx, detectando una correlación positiva con la paridad en los anticuerpos frente a la toxina ApxII, mientras que la correlación fue negativa en los anticuerpos frente a la toxina ApxIII y frente a una Omp, así como Sjölund et al. (2011b), que observaron que, a diferencia de nuestro estudio, las cerdas con mayores niveles de anticuerpos eran las de primer parto, seguramente debido a una infección reciente, lo que viene a remarcar la importancia que puede tener la adaptación de la reposición a la hora de tener unos niveles adecuados de inmunidad maternal frente a *A. pleuropneumoniae*.

Lo que sí queda patente en nuestro estudio y en los estudios anteriormente referidos, es que el nivel de anticuerpos de las cerdas condiciona el nivel de anticuerpos de sus lechones, y este nivel de anticuerpos en las cerdas está determinado por diversos factores, entre ellos, el grado de exposición a estos antígenos que hayan podido tener (Crujisen et al., 1995c). Por un lado, por su grado de exposición a *A. pleuropneumoniae*, ya que como nuestros resultados sugieren, teniendo en cuenta que únicamente se han evaluado 7 cerdas, la exposición a los diferentes serotipos es completamente diferente en cada una de ellas, y esto tiene como consecuencia que el grado de exposición a la diferentes toxinas también haya sido diferente, de forma muy interesante, únicamente se observa cierta homogeneidad en el nivel de anticuerpos frente a

aquellos antígenos que están compartidos por todos los serotipos de la bacteria, es decir la toxina ApxIV y la proteína OmpA. Pero además hay que tener en cuenta que las toxinas ApxI-III no son específicas de *A. pleuropneumoniae*, lo que tiene como consecuencia que el grado de exposición a otras bacterias productoras de toxinas Apx o con una estructura antigénica similar (Frey, 2019; Kamp et al., 1994; Schaller et al., 2000), aunque no tenga consecuencias patológicas, sí que las va a tener desde el punto de vista de antigenicidad. La exposición a estas bacterias va a generar una exposición a sus toxinas que puede redundar en un incremento en la inmunidad maternal frente a las toxinas Apx, aun sin haber estado las cerdas expuestas a *A. pleuropneumoniae* (Cruijssen et al., 1995c). En este estudio, este fenómeno se ha observado en la granja B, en la que, aunque no se puede discernir si los anticuerpos que presentan los lechones a las 4 semanas de edad son de origen pasivo o activo, queda patente que en una granja negativa a *A. pleuropneumoniae* hay una o varias bacterias que están generando inmunidad frente a una toxina ApxII. Esto nos lleva a la reflexión de que la detección de anticuerpos frente a toxinas ApxI-III tiene muy poca especificidad en lo que a la detección de animales infectados por *A. pleuropneumoniae* se refiere, si bien el objetivo del presente estudio no es analizar el grado de especificidad y sensibilidad de las técnicas, para lo que sería necesario la realización de estudios adicionales.

La detección en una granja de la presencia de más de un serotipo de *A. pleuropneumoniae*, como ha sido nuestro caso, no es un hecho infrecuente, sino que confirma los resultados obtenidos por otros autores que han realizado la misma observación, detectando granjas infectadas por múltiples serotipos (Broes et al., 2007; Chiers et al., 2002a; Maes et al., 2002; Dunlop & Mcorist, 2021). De hecho, el trabajo de Maes et al., (2002) refleja el riesgo que suponen los cambios de origen en la reposición por el efecto que pueden tener en la entrada de nuevos serotipos en la granja, por ello diversos autores inciden en la importancia de la monitorización de la reposición antes de la entrada a granja (Broes et al., 2007; Gottschalk, 2015; Gottschalk & Broes, 2019).

En el presente estudio, si bien se observa la presencia de diversos serotipos entre las cerdas, posiblemente el hecho más relevante lo constituye la detección de una cerda negativa a todos los serotipos investigados, así como a la toxina ApxIV, siendo además una cerda de primer parto. Esto invita a la reflexión acerca de las consecuencias que puede llegar a tener la incorporación al hato reproductor de una reposición que es negativa a los serotipos presentes en la granja, sin una buena aclimatación a dichos serotipos, dando lugar a la llegada a su primer parto sin unos niveles homogéneos con el resto de reproductoras de anticuerpos protectores frente a la clínica por *A. pleuropneumoniae*, para poder transmitirlos a su descendencia. Sobre esto no hay estudios publicados. Sin embargo, como refleja este trabajo y en concordancia con otros

autores, el nivel de anticuerpos en las madres determina el nivel de anticuerpos maternos en su progenie, y tal y como sugieren múltiples estudios, este nivel de anticuerpos en los lechones y su duración determina el grado de protección de estos frente a la enfermedad clínica (Crujisen et al., 1995b,c; Nechvatalova et al., 2005; Sjölund et al., 2011b; Velthuis et al., 2003; Vigre et al., 2002). Así pues, en base a los resultados de este trabajo, aquellos lechones procedentes de esta cerda negativa son los que presentan unos niveles más bajos de inmunidad maternal frente a los diversos antígenos de *A. pleuropneumoniae*. Esto puede hacer que sean animales susceptibles a la enfermedad antes que sus compañeros de lote, con la posibilidad de que una vez que se infecten en ausencia de niveles de anticuerpos maternos suficientes inicien la sintomatología clínica, tal y como han reflejado algunos estudios (Crujisen et al., 1995a; Klinkenberg et al., 2014), pero en este caso, a edades más tempranas de las habituales. Este hecho sugiere que la presencia de lechones sin anticuerpos maternos específicos frente a las toxinas Apx podría ser el motivo de la aparición de los brotes tempranos de la enfermedad (entre la 4ª y la 10ª semana) que se detectan en algunas granjas. No podemos olvidar que tal y como expone el estudio de Vigre et al. (2002), la edad a la que la transmisión horizontal de la bacteria tiene su máxima expresión es precisamente entre las semanas 4ª y 12ª de vida. En este sentido, Fitzgerald et al. (2020), observaron en un estudio serológico frente a la toxina ApxIV realizado en animales al final de la fase de engorde, una asociación entre estos niveles y la paridad de la cerda de procedencia, de tal modo que los lechones procedentes de cerdas primerizas presentaban mayores niveles de seroconversión a la toxina ApxIV que los lechones procedentes de cerdas multíparas, sugiriendo que probablemente fuese debido a una mayor exposición al patógeno, probablemente debido a una menor inmunidad pasiva transferida por las cerdas primíparas, tal y como nuestros resultados sugieren.

Por otro lado, entre los lechones procedentes de esta cerda negativa a todos los antígenos, curiosamente se observa la presencia de algunos lechones con anticuerpos maternos frente a las toxinas ApxII, ApxIII, ApxIV o la proteína OmpA, lo que viene a matizar el resultado negativo de la madre, dado que como Klobasa et al. (1981) refieren, los anticuerpos se concentran en el calostro de la cerda, y este puede presentar unos niveles más elevados que el suero del animal del que procede, lo que tiene como consecuencia, como algunos estudios han advertido, que los lechones al encalostrarse, presenten durante los primeros días unos niveles de anticuerpos de origen maternal en suero más elevado que los de sus progenitoras (Curtis & Bourne, 1971; Kristensen et al., 2004a), tal y como hemos observado con todas las pruebas evaluadas, no sólo con estos lechones procedentes de la cerda negativa, sino con lechones de la mayoría de las camadas.

No obstante, en el caso concreto de la cerda negativa, el hecho de observar en sus lechones unos niveles detectables de anticuerpos frente a *A. pleuropneumoniae*, puede ser un indicativo de un antiguo contacto de esta cerda con la bacteria. En base a que no se hayan producido contactos más recientes, los niveles de anticuerpos podrían haber disminuido hasta ser indetectables mediante pruebas serológicas, aunque sin embargo estén presentes en el animal, hecho que daría lugar a un falso negativo, tal y como han también han mencionado otros autores (Dreyfus et al., 2004; Eamens et al., 2012a). De hecho, estos falsos negativos son el motivo por el cual algunos estudios recomiendan realizar muestreos de al menos 30 animales para establecer el estatus de una granja frente a *A. pleuropneumoniae* (Dunlop & Mcorist, 2021). Por otra parte, tampoco se puede descartar el hecho de que estos lechones no procediesen biológicamente de esta cerda, dado que el estudio se ha llevado a cabo a nivel de campo y no en un entorno experimental.

El hecho de que la producción de toxinas sea inherente al serotipo, y que no haya ningún serotipo que produzca las tres toxinas ApxI-III (Beck et al., 1994), implica que al haber sido las cerdas infectadas por varios serotipos diferentes no sea fácil determinar que serotipo es el responsable de generar los anticuerpos frente a una determinada toxina. Sin embargo, la mayor parte de los serotipos producen toxina ApxII y todos producen ApxIV (Frey, 2019), lo que podría llevar a que, en granjas infectadas por varios serotipos, como es el caso de la granja A, las cerdas tengan unos niveles de anticuerpos más elevados frente a estas dos toxinas, probablemente debido a exposiciones reiteradas a *A. pleuropneumoniae*. O incluso, en el caso de la toxina ApxII, a otras bacterias apatógenas habituales en el cerdo, también productoras de toxina ApxII o antigénicamente relacionadas con esta (Frey, 2019; Schaller et al., 2000). Estas cerdas pueden transferir una mayor cantidad de anticuerpos maternos a su descendencia frente a estas dos toxinas, explicando así el mayor nivel inicial y la mayor duración que tienen estos anticuerpos maternos respecto al resto de toxinas y proteínas estudiadas. En el caso de ApxI podemos observar que hay menos serotipos presentes en las cerdas que produzcan esta toxina, generando una menor exposición a este antígeno y por tanto una menor transmisión a sus lechones. Sin embargo, esto no se observa de igual modo con la proteína OmpA, que aun estando también presente en todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae* y pudiendo presentar reacciones serológicas cruzadas con otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae* habituales en el cerdo como *Pasteurella multocida* o *Glaesserella parasuis* (Eamens et al., 2012b), los niveles y duración de los anticuerpos que se generan no son tan elevados como en el caso de las toxinas ApxII y ApxIV. De igual modo sucede con la toxina ApxIII, que, si bien la mayor parte de las cerdas están expuestas a serotipos productores de esta toxina, sus niveles y los de sus lechones no son

tan elevados como para ApxII y ApxIV. Esto abre la puerta a pensar en la posibilidad de que todos los antígenos no sean igual de inmunogénicos, sugiriendo estos hallazgos que las toxinas ApxII y ApxIV pudiesen generar mayores respuestas que al menos la toxina ApxIII y la proteína OmpA. Pero esto se tiene que confirmar mediante estudios adicionales.

Por otro lado, tal y como sugiere el trabajo de Klinkenberg et al. (2014), la presencia o ausencia de anticuerpos maternos parece tener una gran influencia en el desarrollo de brotes clínicos frente a la enfermedad. Sobre todo, en los casos en los que mientras se está produciendo la transmisión horizontal, hay animales perdiendo la inmunidad maternal, normalmente entre las semanas 4ª y 12ª (Vigre et al., 2002), que tal y como observamos en nuestro estudio es cuando en la mayoría de los animales ya no hay o están declinando los anticuerpos calostrales frente a algunas de las toxinas Apx, que son los que en mayor medida ejercen la protección clínica tal y como observan Crujisen et al. (1995c).

Tobias et al. (2014b) detectan que la colonización de los lechones se produce agrupada por camadas, y tanto en nuestro estudio como en el trabajo de Vigre et al. (2003), se observa que los diferentes niveles de anticuerpos calostrales también están agrupados por camada. Cabe la posibilidad de que ambos hechos pudiesen estar relacionados, es decir, cerdas con bajo nivel de anticuerpos, generan lechones con bajo nivel de anticuerpos calostrales, que son las camadas más susceptibles de ser infectadas. No obstante, serían necesarios estudios adicionales para establecer esta relación.

Por otra parte, Tobias et al. (2014a) refieren que un nivel elevado de anticuerpos frente a la toxina ApxII en las cerdas antes del parto, se asocia significativamente con una baja probabilidad de infección para su descendencia después del destete. No obstante, este estudio cuantificó los anticuerpos frente a toxinas Apx y proteína OmpA en las cerdas, y seguramente esta menor tasa de colonización podría estar ligada a anticuerpos maternos frente a otras estructuras de la bacteria, tal y como sugiere Vigre et al. (2003), en su estudio a acerca de los anticuerpos maternos serotipo específicos frente al serotipo 2. En él, observa cómo dos semanas después del nacimiento los animales son susceptibles a la infección por *A. pleuropneumoniae*, sugiriendo que estos anticuerpos maternos específicos de serotipo podrían ser los que en elevadas cantidades ejercen una protección frente a la colonización por la bacteria. Aunque otros estudios también refieren que los animales podrían ser colonizados por *A. pleuropneumoniae* en presencia de esta inmunidad maternal (Chiers et al., 2002a; Nechvatalova et al., 2005). No obstante, tal y como el presente estudio pone de manifiesto, y en concordancia con el trabajo de Crujisen et al. (1995c), la duración de los anticuerpos maternos frente a las toxinas Apx

puede llegar a ser mucho mayor, como hemos observado con la ApxII, con una vida media de 6 semanas, y detectando a las 10 semanas de vida aún un 42,5% de animales con anticuerpos maternos. Estos anticuerpos podrían ser los responsables de que, si bien los animales pueden ser colonizados a edades más tempranas, están protegidos frente a las toxinas Apx hasta el agotamiento de los mismos, ya entrada la fase de cebo. Diversos autores coinciden en que unos niveles elevados de anticuerpos maternos frente a las toxinas Apx inducen protección clínica frente a la enfermedad ocasionada por *A. pleuropneumoniae* (Crujisen et al., 1995c; Devenish et al., 1990; Furesz et al., 1997), lo que daría explicación al hecho de que la mayoría de los brotes clínicos de la enfermedad se produzcan en fase de cebo (Gottschalk & Broes, 2019), aunque la infección y transmisión de la bacteria es elevada a edades más tempranas. Este hecho viene a reflejar la importancia que podría tener mantener unos niveles elevados de inmunidad en las cerdas frente a las toxinas Apx, de forma que esta inmunidad pudiera ser transmitida vía calostro a su descendencia, con el objetivo de proporcionar una inmunidad materna alta y equilibrada frente a las tres toxinas, para así evitar brotes tempranos de la enfermedad cuando los lechones están alojados en un entorno de alta transmisión de la bacteria. Además, como sugiere el estudio de Nechvatalova et al. (2005), la mejor protección se obtiene cuando los animales son expuestos a una dosis baja de bacteria con un estatus elevado de inmunidad materna. Así pues, esto sugiere la necesidad de evaluar mediante estudios adicionales, el efecto que podría tener la vacunación de reproductoras con vacunas basadas en toxinas Apx, de manera que se homogeneizaran y elevaran los anticuerpos maternos frente a dichas toxinas en sus lechones con el objetivo de estar protegidos hasta edades más avanzadas, tal y como también coinciden Kristensen et al. (2004a).

Sin duda, que unos de los resultados más interesantes de este trabajo lo ofrecen los obtenidos en los animales a la 18ª semana de vida, en los que se observan unos niveles medios de anticuerpos más bajos que en los mismos animales a la 10ª semana de edad, no detectándose seroconversión con ninguna de las pruebas realizadas. Analizando los resultados obtenidos con cada una de las pruebas, en cada animal en particular, se observa como frente a las toxinas ApxI y ApxIII no se detecta ningún animal con anticuerpos a la 18ª semana, lo que induce a pensar que no se ha producido infección por ningún tipo de bacteria productora de estas toxinas.

Sin embargo, en el caso de la toxina ApxII, podemos observar que se detectan 3 animales positivos, aunque con niveles de anticuerpos bajos, cercanos al punto de corte y resultando negativos frente al resto de pruebas serológicas, lo cual teniendo en cuenta el grado de especificidad que diversos autores refieren para el test ELISA frente a la toxina ApxIV, un 100% según Dreyfus et al. (2004), sugiere que la seroconversión de estos animales podría ser debida

a una producción de toxina por otras bacterias como podrían ser *Actinobacillus porcitonisillarum*, *Actinobacillus rossii* o *Actinobacillus suis* o incluso por otra bacteria productora de toxinas antigénicamente relacionadas con la toxina ApxII, tal como refieren algunos autores (Frey, 2019; Kamp et al., 1994; Schaller et al., 2000).

En el análisis pormenorizado de los resultados frente a la toxina ApxIV, si bien hemos observado que todos los animales están por debajo del punto de corte establecido como positivo, se detectó que tres animales presentaban niveles de anticuerpos que podrían arrojar un resultado dudoso, con lo que se decidió repetir la prueba, arrojando el mismo resultado. No obstante, cuando se analizan en detalle los tres animales que presentan este resultado dudoso, se observan dos circunstancias interesantes, la primera es que al igual que en el caso anterior, en ninguno de los tres animales se observa seroconversión en ninguna de las otras pruebas realizadas. Y, sobre todo, se identifica que estos animales a la 10ª semana de vida presentaban aún unos niveles muy elevados de anticuerpos frente a la toxina ApxIV, por lo que con toda probabilidad estos resultados se deban a la persistencia de títulos ya muy bajos de anticuerpos maternos. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Jirawattanapong et al. (2008), que muestran que la inmunidad materna frente a la toxina ApxIV puede persistir hasta la semana 14ª de edad. Este resultado afianza aún más la observación realizada anteriormente acerca de la complejidad a la hora de interpretar los resultados ofrecidos por los kits ELISA de detección de anticuerpos frente a toxina ApxIV de cara a establecer protocolos vacunales que eviten la interferencia con la inmunidad materna frente a las toxinas ApxI-III.

En el análisis individualizado de los resultados obtenidos frente a la proteína OmpA, se detectan 4 animales positivos, que al igual que los casos anteriores, no presentaban seroconversión con el resto de las pruebas. En este caso, de forma parecida a lo que sucede con los anticuerpos frente a la toxina ApxII, hay que tener en cuenta, que las Omp de otras bacterias del género *Pasteurellaceae* dan lugar a reacciones serológicas cruzadas con esta prueba, estando estos resultados en la línea de los obtenidos por Eamens et al. (2012b) Estos autores si bien observaron una buena correlación entre las pruebas serológicas frente a OmpA y ApxIV, también advirtieron que animales infectados por *Pasteurella multocida* o *Glaesserella parasuis* daban lugar a cierta seroconversión con la prueba frente a la OmpA, lo que hacía a esta prueba menos específica para detectar animales infectados por *A. pleuropneumoniae*.

Así pues, ninguno de los animales ha presentado al mismo tiempo anticuerpos frente a alguna de las toxinas ApxI-III, y más importante aún, frente a la toxina ApxIV y la proteína OmpA, siendo ambas dos de las proteínas más abundantes y conservadas en el exoproteoma de todos los

serotipos de *A. pleuropneumoniae* y teniendo una alta expresión durante la fase activa de la infección tal y como observan Brogaard et al. (2015) y Stancheva et al. (2022). De hecho, son dos de los indicadores más importante de una infección por la bacteria, pudiendo constituir su uso conjunto una herramienta muy valiosa a la hora de la interpretación de los diferentes resultados que se pueden obtener en una granja mediante pruebas serológicas, tal y como también sugieren Eamens et al. (2012a,b). En cualquier caso, y en concordancia con lo sugerido por otros autores (Broes et al., 2007; Dunlop & Mcorist, 2021), los resultados observados en la semana 18ª indican la utilidad de realizar las pruebas serológicas frente a más de un antígeno de *A. pleuropneumoniae*, en lugar de realizarlas frente a un único antígeno, que suele ser la práctica habitual, de cara a interpretar correctamente los resultados obtenidos, dada la complejidad de hacer interpretaciones con una única prueba por la influencia que parecen tener tanto la inmunidad maternal, como las reacciones serológica cruzadas debidas a infecciones por otras bacterias, así como los diferentes plazos para la seroconversión con cada una de ellas. Como algunos autores han referido, la seroconversión frente a la proteína OmpA es muy rápida, una semana tras una infección experimental (Eamens et al., 2012a,b), mientras que la seroconversión frente a la toxina ApxIV puede llevar más tiempo, de 1 a 4 semanas tras la infección (Dreyfus et al., 2004; Eamens et al., 2012a,b; Opriessnig et al., 2013). Por lo que, vistos los resultados obtenidos en nuestro estudio, se podría establecer, que al menos hasta la semana 14ª los animales pudieron permanecer sin infectarse por *A. pleuropneumoniae*, teniendo en cuenta que, una de las limitaciones de este estudio, es no haber realizado pruebas de detección de la bacteria mediante PCR en tonsila. Tal y como sugieren Chiers et al. (2002b), los animales se pueden colonizar a nivel nasal o tonsilar por *A. pleuropneumoniae* y no desarrollar niveles de anticuerpos detectables en suero, si bien dicho estudio se llevó a cabo únicamente mediante detección de anticuerpos frente a las toxinas ApxI-III, y tal y como otros autores refieren, este efecto se atenúa incrementando el tamaño de los muestreos al menos a 30 animales (Dunlop & Mcorist, 2021; Opriessnig et al., 2013).

Por tanto, dado que el protocolo profiláctico aplicado durante este trabajo estuvo motivado por la necesidad de asegurar que los anticuerpos detectados hasta la semana 10ª de vida se debiesen a inmunidad maternal, y no a inmunidad activa tras una infección, estos resultados sugieren que el objetivo quedo cumplido, al no hallar en ninguna de las pruebas evaluadas un incremento en el nivel de anticuerpos no solo hasta la semana 10ª, sino también hasta la semana 18ª. Esto podría implicar que, aunque no se han realizado estudios microbiológicos para estudiar la colonización a nivel tonsilar o pulmonar, y no se ha establecido un grupo control para atestiguar que este lote se estaba produciendo transmisión vertical u horizontal, tal y como se

ha dado por supuesto, dada la clínica observada en cebo en lotes previos y posteriores a este, así como en los animales del mismo lote que no estaban sometidos a tratamiento; tanto la transmisión de madre a lechón, como la colonización por parte de los lechones participantes en el estudio parecen haberse evitado. Esto corroboraría los resultados obtenidos por Kuchiishi et al. (2023), que establecieron un protocolo para evitar el contagio de los lechones por parte de sus madres mediante el uso de otro antibiótico; tildipirosina, con la diferencia de que únicamente se aplicó una dosis en cerdas, mientras que en nuestro caso fueron dos dosis, y las dosis en lechones se separaron 7 días, desde nacimiento hasta destete, donde finalizó el estudio, mientras que en nuestro caso se separaron 14 días, llegando hasta la semana 16ª. Los resultados obtenidos por nuestro estudio también concuerdan con los diversos estudios que han demostrado la eficacia de la tulatromicina y marbofloxacin tanto *in vitro* como *in vivo* para destruir a la bacteria o para mejorar la sintomatología clínica en los animales afectados por la enfermedad (Dorey et al., 2017a; Grandemange et al., 2017; Hart et al., 2006; Sjölund et al., 2009). Sin embargo, ninguno de estos estudios estaba enfocado en prevenir el contagio de los lechones, como ha sido el objetivo del protocolo que hemos llevado a cabo, si bien nuestro estudio tiene la limitación de no haber realizado estudios bacteriológicos a nivel tonsilar y basar la eficacia únicamente en los resultados serológicos. No obstante, es importante remarcar, tal y como sugiere el trabajo de Sjölund et al. (2009), que el hecho de no haber permitido un contacto previo de la bacteria, puede conllevar que una vez retirado el protocolo, y estando los animales en un entorno susceptible de ser infectados, la situación pudiera desembocar en una enfermedad grave, por lo que surge la duda de si a nivel de control de la enfermedad, es más eficiente evitar el contagio hasta el final de la vida productiva de los animales, o más bien tal y como sugieren Nechvatalova et al. (2005), permitir el contagio en presencia de inmunidad maternal, donde la enfermedad será menos grave, dado que la mayor parte de los animales estarán protegidos clínicamente, quedando así mejor protegidos frente a futuras infecciones. Además, desde este punto de vista de control de la enfermedad, el uso de este protocolo es cuestionable a nivel práctico por la repercusión que podría tener un uso elevado de antibióticos, dado el contexto actual de disminución en el uso de estos con el fin de evitar la aparición de resistencias. En cambio, podría ser de utilidad en un contexto de necesidad de producción de animales negativos por parte de una granja positiva para el llenado de nuevas estructuras, aunque tal y como se ha sugerido anteriormente, sería necesario realizar estudios adicionales para confirmar los resultados obtenidos.

En el caso de los resultados obtenidos en la granja negativa a *A. pleuropneumoniae* con las pruebas serológicas frente a la toxina ApxIV y frente a la OmpA, estos resultados están en la

línea de los obtenidos por Dreyfus et al. (2004) y Eamens et al. (2012a,b), en cuanto al buen grado de especificidad de la prueba frente a la ApxIV y la buena complementariedad con la prueba frente a la OmpA, la cual presenta un mayor grado de sensibilidad. Si bien en este caso no se detectó ningún animal positivo con ninguna de las dos pruebas, lo que viene a confirmar de forma fehaciente la negatividad de la granja frente al patógeno. En este punto, merece la pena tener en consideración el hallazgo de Tegetmeyer et al. (2008), que observó la existencia de elementos de inserción en el gen que codifica la toxina ApxIV, únicamente detectados en un serotipo 7, que dan lugar a que no se produzca una toxina ApxIV funcional, y que por tanto no haya respuesta inmune en los animales frente a esta. Esto, a pesar de ser un hallazgo casual, viene a remarcar de nuevo la importancia de combinar diferentes pruebas serológicas para obtener unos resultados fiables.

Mención aparte merecen los resultados obtenidos con la prueba frente a la toxina ApxII, con la mitad de los animales presentando anticuerpos frente a la misma, lo cual, teniendo en cuenta que esto se produce en una granja negativa *A. pleuropneumoniae*, viene a confirmar lo descrito por diversos autores. La toxina ApxII puede ser producida por otras bacterias presentes en el cerdo como *A. suis*, *A. porcitosillarum* y *A. rossii*, así como otras bacterias que pueden producir toxinas antigénicamente similares a la toxina ApxII, dando lugar a reacciones serológicas cruzadas (Frey, 2019; Kamp et al., 1994; Schaller et al., 2000). No obstante, el hecho de que únicamente se detectasen anticuerpos frente a la toxina ApxII y no frente a las toxinas ApxI o ApxIII, sugieren que los anticuerpos puedan ser debidos a la presencia en la granja de *A. porcitosillarum*, ya que es la única de estas bacterias que produce únicamente ApxII, que es la única bacteria que posee el operón completo *apxIICABD*, siendo capaz de producir y secretar la toxina. El resto de las bacterias mencionadas, incluida *A. pleuropneumoniae* han perdido parte del gen, utilizando el sistema de secreción de la toxina ApxI para secretar la toxina ApxII (Kuhnert et al., 2005). La detección de anticuerpos frente a la toxina ApxII producida por otras bacterias, también ha sido documentada en el trabajo de Stancheva et al. (2022), aduciendo que la toxina ApxII producida por *A. pleuropneumoniae* tenía una secuencia idéntica en un 99% a la producida por *A. rossii* y *A. porcitosillarum*, así como un 98,2% de homología con la producida por *A. suis*.

En el caso de la granja B, la prevalencia de animales positivos a la prueba frente a la toxina ApxII es muy similar a la 4ª y a la 10ª semana, a diferencia de lo que sucede en la granja A, donde son más reducidos a la 10ª que a la 4ª semana. Este hecho sugiere que estos anticuerpos podrían no ser únicamente de origen maternal, sino también debidos a una infección activa por alguna de las bacterias mencionadas anteriormente, que no tienen expresión clínica en el cerdo (salvo *A. suis* en algunos casos). Este hallazgo estaría en consonancia con las observaciones realizadas por

Tumamao et al., (2004a) que observaron como animales provenientes de un rebaño libre de *A. pleuropneumoniae* presentaban anticuerpos frente a la toxina ApxII, que, en lugar de disminuir, se incrementaban entre las semanas 3ª y 6ª de vida.

No obstante, en este estudio no hemos llevado a cabo técnicas adicionales como cultivos o PCR de raspados tonsilares, aunque tal y como describen algunos autores la posibilidad de cultivo de estas bacterias a partir de muestras tonsilares es escasa por ser un órgano especialmente contaminado con otras bacterias de más fácil crecimiento (Fittipaldi et al., 2003; Gottschalk, 2015). Por otro lado no hay disponibles técnicas rutinarias de diagnóstico por PCR para las bacterias productoras de toxinas ApxII, con la excepción de *A. pleuropneumoniae* y *A. suis*.

La buena concordancia obtenida, al menos en lo que respecta a la detección de animales negativos a *A. pleuropneumoniae*, entre las pruebas serológicas frente a la toxina ApxIV y la proteína OmpA está en línea con los resultados observados por Eamens et al. (2012b). Aun así, hay que tener en cuenta las limitaciones del test para ésta última, dada la posibilidad de resultados falsos positivos por la detección de anticuerpos producidos frente a proteínas Omp de otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae*, como parece haberse producido en algún animal del grupo A a las 18 semanas de vida, si bien no se ha detectado ningún caso de reacción cruzada en la granja B. No obstante, en caso de las pruebas frente a la toxina ApxIV, es importante tener en cuenta el tiempo necesario después de una exposición a *A. pleuropneumoniae* durante el cual los animales se mantienen negativos, tal y como algunos autores han observado (Dreyfus et al., 2004; Eamens et al., 2012a,b; Opriessnig et al., 2013), que puede llegar a ser de hasta entre 4 y 6 semanas, así como el tiempo tras positivizar en el que los animales vuelven a ser negativos. A este respecto, Eamens et al. (2012b) encontraron que algunos animales a las 4-6 semanas tras positivizar, debido a una infección experimental, volvían a ser negativos, lo que viene de nuevo a reflejar la importancia del tamaño de muestra a la hora de establecer el estatus de un rebaño. Sin embargo, tal y como Eamens et al. (2012a) observaron, el tiempo que necesitan los animales una vez infectados para seroconvertir frente a la OmpA es sustancialmente más reducido (7 días), lo que viene de nuevo a reflejar la excelente complementariedad entre ambas técnicas.

Por otro lado, los resultados obtenidos por el presente estudio con las pruebas frente a las toxinas Apx I-III sugieren, en concreto los detectados con la prueba frente a la toxina ApxII, una mala concordancia con el resto de las pruebas para la detección de animales negativos a *A. pleuropneumoniae*, que también podría observarse con las pruebas frente a las toxinas ApxI y ApxIII, dado que ninguna de estas toxinas es específica de esta bacteria, tal y como reportan

diversos autores (Frey, 2019; Kamp et al., 1994; Schaller et al., 2000). Así pues, estos resultados hacen prever una elevada sensibilidad con una baja especificidad, tal y como ha sido observado por otros estudios (Crujisen et al., 1995c; Opriessnig et al., 2013; Stancheva et al., 2022). Esto se debe confirmar mediante pruebas adicionales con animales confirmados como positivos. Es probable que la mejor utilidad de las pruebas serológicas frente a las toxinas ApxI-III, sea la de determinar la duración de los anticuerpos maternos frente a las mismas, de cara a establecer los protocolos vacunales más apropiados en aras de evitar la interferencia con la inmunidad maternal, tal y como también ha sido sugerido por Tumamao et al., (2004a) y Jirawattanapong et al. (2008).

Debido a que las proteínas utilizadas en nuestro estudio eran de origen recombinante, tal y como sugieren Shin et al. (2013) y Jung et al. (2019) y en consonancia con los resultados obtenidos por estos autores, no parecen haberse detectado reacciones serológicas cruzadas entre las toxinas ApxI-III, como sí han sido detectadas en otros trabajos, bien por utilizar técnicas de seroneutralización o bien por utilizar proteínas purificadas para desarrollar las técnicas serológicas (Chiers et al., 2002a; Crujisen et al., 1995c; Giménez-Lirola et al., 2014; Nielsen et al., 2000).

7. CONCLUSIONES

1. El nivel de anticuerpos frente a las toxinas Apx y a la OmpA que presentan las cerdas, que está condicionado por la exposición frente a los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae* u otras bacterias productoras de toxinas Apx o con proteínas antigénicamente similares a la OmpA, determina el nivel de anticuerpos frente a estos antígenos en sus lechones.
2. La vida media de los anticuerpos maternos es diferente según el antígeno de *A. pleuropneumoniae* que se evalúe, por lo que puede entrañar cierto riesgo asumir que los niveles de anticuerpos maternos obtenidos frente a un antígeno determinado van a ser iguales para el resto de los antígenos, sobre todo cuando se realizan estas pruebas para establecer protocolos vacunales en aras de evitar interferencia entre vacunas e inmunidad maternal.
3. La duración de los anticuerpos maternos frente a las proteínas Apx podría ser más elevada que frente a otras estructuras de la superficie bacteriana como la proteína OmpA, llegando a detectarse más allá de la semana 10ª de vida.
4. Los niveles de anticuerpos maternos frente a ApxI-IV y OmpA en lechones a las 24 horas de vida pueden ser superiores a los de su progenitora. En caso de cerdas negativas se debería realizar una revisión indirecta a través de sus lechones.
5. Podría existir una asociación entre la paridad de las cerdas y los niveles de anticuerpos en sus lechones frente a *A. pleuropneumoniae*, con una importante variabilidad entre camadas e incluso entre lechones dentro de la misma camada. Estos resultados deberían ser corroborados con un tamaño muestral mayor.
6. En cerdas de la misma granja infectadas por diferentes serotipos, se genera un grado diferente de exposición a las toxinas, y por tanto una heterogeneidad en los niveles

de anticuerpos frente a las mismas, en ellas y consecuentemente en sus lechones. Se puede incluso detectar la presencia de cerdas negativas a todos los serotipos.

7. Se puede producir la llegada de cerdas seronegativas a su primer parto, generando lechones sin anticuerpos maternos protectores frente a la clínica por *A. pleuropneumoniae*.
8. Los diferentes antígenos de *A. pleuropneumoniae* podrían no tener el mismo grado de antigenicidad, sugiriéndose una mayor respuesta a las toxinas ApxII y IV que al resto de antígenos.
9. Las pruebas serológicas frente a toxinas ApxI-III dan lugar a un elevado número de falsos positivos. Consecuentemente estas pruebas tienen una baja especificidad para evaluar la negatividad de los animales a *A. pleuropneumoniae*.
10. La transmisión del patógeno de madre a lechón y entre lechones, se podría evitar mediante el uso del protocolo profiláctico antibiótico propuesto en este trabajo.
11. Hay una buena concordancia para detectar animales negativos entre ApxIV y OmpA, y una mala concordancia entre ApxII con el resto de las pruebas. El uso conjunto de diferentes pruebas serológicas podría constituir la mejor estrategia para la interpretación de la situación frente a *A. pleuropneumoniae* en una granja.

8. RESUMEN

La pleuroneumonía porcina ocasionada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial que afecta a la cabaña porcina, ocasionando brotes de la enfermedad principalmente en la fase de cebo. La clínica se caracteriza por una sintomatología respiratoria severa con elevada mortalidad, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas. Las principales estrategias de manejo de la enfermedad están basadas en tratamientos antibióticos, la prevención de los síntomas clínicos mediante vacunación y el establecimiento de unas medidas apropiadas de bioseguridad. Los anticuerpos maternos frente a la bacteria juegan un papel importante tanto en la prevención de brotes clínicos en primeras edades, como en la interacción con las vacunas aplicadas a edades tempranas.

En este trabajo se ha realizado un estudio de la evolución desde el nacimiento hasta la 10ª semana de vida de los anticuerpos maternos frente a las toxinas RTX (ApxI, II, III y IV) y frente a la proteína OmpA de *A. pleuropneumoniae*. Para este fin se han empleado pruebas de ensayo inmunoenzimático (ELISA) frente a las toxinas Apx I, II, III, y IV y la proteína OmpA en 42 lechones procedentes de 7 cerdas de una granja comercial positiva a la bacteria. Así pues, se tomaron muestras de suero sanguíneo de las cerdas a las 24 horas post parto y de los lechones a las 24 horas, y posteriormente cada 7 días, hasta la 10ª semana de vida, de forma que se pudiese determinar la dinámica y duración de estos anticuerpos.

Otro de los objetivos del presente trabajo fue evitar que los lechones fuesen colonizados por la bacteria que se pudiese transmitir por parte de la madre u otros animales del mismo lote no pertenecientes a la prueba, y que de este modo los anticuerpos detectados se debiesen exclusivamente a los transmitidos por su madre a través del calostro. A este fin, se llevó a cabo un protocolo consistente en el tratamiento de todas las cerdas reproductoras del lote semanal con marbofloxacin a 8 mg/kg el día del parto, así como a los 11 días de lactación. Por otro lado, los 42 lechones seleccionados para el estudio fueron tratados con una dosis de tulatromicina a 5 mg/kg cada 14 días desde la segunda hasta la decimosexta semana de edad. Para evaluar la eficacia de dicho protocolo, se tomaron muestras de suero de estos animales en la 18ª semana de edad, así como fueron evaluados clínicamente una vez por semana durante el curso del estudio.

Otro objetivo de este trabajo fue realizar una evaluación del comportamiento de estas pruebas serológicas frente a las toxinas ApxI-IV y la proteína OmpA en animales negativos a *A. pleuropneumoniae*, analizando la posible presencia de anticuerpos debido a otros patógenos con producción de toxinas ApxI-III u otras toxinas RTX antigénicamente relacionadas, o con

proteínas de membrana que pudiesen presentar reacción serológica cruzada con las pruebas empleadas. Para ello, se seleccionaron 42 animales procedentes de una granja negativa a *A. pleuropneumoniae*, a los que se les tomó muestras de suero a la 4ª y 10ª semana de vida.

Una vez analizados los resultados, se observó que en todos los casos el nivel de anticuerpos de la madre condiciona el nivel de anticuerpos de los lechones a las 24 horas. La vida media de estos anticuerpos puede ser muy diferente en función del antígeno de que se trate, encontrando vidas medias inferiores a las 2-3 semanas en el caso de los anticuerpos frente a las toxinas ApxI, ApxIII y la proteína OmpA, así como vidas medias más elevadas en el resto, superando en el caso de la ApxII las 5 semanas y en el caso de la ApxIV las 8 semanas, llegando a encontrarse con estas dos últimas un considerable número de animales con anticuerpos maternos a la 10ª semana de vida.

Además, se observa como la cantidad de anticuerpos maternos no es homogénea en todos los lechones a las 24 horas de vida. Esta heterogeneidad está influida por el nivel de anticuerpos de la progenitora, que a su vez está determinado por el grado de exposición que ha tenido a *A. pleuropneumoniae* y a sus diferentes toxinas. Se ha llegado a detectar la presencia de una cerda seronegativa en su primer parto, dando lugar a la presencia de lechones con títulos muy bajos de anticuerpos frente a *A. pleuropneumoniae*, con el riesgo que este hecho podría suponer de cara a la aparición de brotes clínicos tempranos de la enfermedad.

Por otro lado, se ha observado un elevado número de animales en la granja negativa con anticuerpos frente a la toxina ApxII. Este hecho indica que aquellos antígenos que pueden estar presentes en otras bacterias, como las toxinas ApxI-III, podrían lugar a la aparición de reacciones serológicas cruzadas con las pruebas ELISA frente a las mismas, presentando por tanto estas pruebas una baja especificidad para la detección de infecciones por *A. pleuropneumoniae*.

En animales negativos, la concordancia observada entre las pruebas para detección de anticuerpos frente a la toxina ApxIV y frente a la proteína OmpA es muy elevada, así como la concordancia de la prueba de detección de anticuerpos frente a la toxina ApxII respecto al resto de pruebas es muy baja. Los resultados observados sugieren que la mejor estrategia para evaluar la situación de una granja respecto a *A. pleuropneumoniae* es la combinación de varias pruebas serológicas frente a distintos antígenos.

Finalmente, con el protocolo profiláctico establecido no se detectó seroconversión de los animales con ninguna de las pruebas realizadas al menos hasta la semana 18ª, pudiendo establecer el éxito de este para evitar el contagio de los animales hasta aproximadamente la semana 14ª de edad.

9. ABSTRACT

Swine pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* is an infectious disease of worldwide distribution that affects pig herds, causing disease outbreaks mainly in the growing and fattening units. The clinical signs are characterised by respiratory disorders with high mortality, causing substantial economic losses. The disease management is based on antibiotic treatments, prevention of clinical signs and mortality through vaccination and the establishment of appropriate biosecurity measures.

Maternal antibodies against the bacterium play an important role both in the prevention of clinical outbreaks in early ages, and in the interaction with vaccines applied at an early age.

In this work, a study has been carried out on the evolution from birth to the 10th week of life of maternal antibodies against RTX toxins (ApxI, II, III and IV) and against the OmpA protein of *A. pleuropneumoniae*. For this purpose, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests against Apx toxins I, II, III, and IV and the OmpA protein have been used in 42 piglets from 7 sows, in a bacterium-positive commercial farm. Thus, blood serum samples were taken from the sows 24 hours postpartum and from the piglets at 24 hours, and then every 7 days, until the 10th week of life, so that the dynamics and duration of these antibodies could be determined.

The second objective of the present work was to prevent piglets from being colonized by the bacterium that could be transmitted by the mother or other animals from the same batch not belonging to the test, and thus that the antibodies detected were due exclusively to those transmitted by their mother through colostrum. To this end, a protocol was carried out consisting of the treatment of all breeding sows in the weekly batch with marbofloxacin at 8 mg/kg on the day of farrowing, as well as at 11 days of lactation. On the other hand, the 42 piglets selected for the study were treated with a dose of tulathromycin at 5 mg/kg every 14 days from the second to the sixteenth week of age. To evaluate the efficacy of such a protocol, serum samples were taken from these animals at 18 weeks of age, as well as clinically evaluated once a week during the course of the study.

The third objective of this work was to evaluate the behaviour of these serological tests against ApxI-IV toxins and the OmpA protein in animals negative for *A. pleuropneumoniae*, analyzing the possible presence of antibodies due to other pathogens with production of ApxI-III toxins or other antigenically related RTX toxins, or with membrane proteins that could present a serological cross-reaction with the tests used. To this end, 42 animals from a farm negative for *A. pleuropneumoniae* were selected from which serum samples were taken at the 4th and 10th week of life.

Once the results were analyzed, it was observed that in all cases, the level of antibodies of the mother conditions the level of antibodies of the piglets at 24 hours. The half-life of these antibodies can be very different depending on the antigen in question, with half-lives of less than 2-3 weeks in the case of antibodies against the toxins ApxI, ApxIII and the OmpA protein, as well as higher half-lives in the rest, exceeding 5 weeks in the case of ApxII and 8 weeks in the case of ApxIV, a considerable number of animals with maternal antibodies were found with the latter two at the 10th week of life. In addition, it is observed that the amount of maternal antibodies is not homogeneous in all piglets at 24 hours of age. This heterogeneity is influenced by the level of antibodies of the sow, which in turn is determined by the degree of exposure it has had to *A. pleuropneumoniae* and its different toxins. The presence of a seronegative sow has been detected in her first farrowing, leading to the presence of piglets with very low titers of antibodies against *A. pleuropneumoniae*, with the risk that this could pose in the face of the appearance of early clinical outbreaks of the disease.

On the other hand, a high number of animals have been observed in the negative farm with antibodies against the ApxII toxin. This fact indicates that those antigens that may be present in other bacteria, such as ApxI-III toxins, could lead to the appearance of serological cross-reactions with ELISA tests against them, thus presenting a low specificity for the detection of *A. pleuropneumoniae* infections.

In negative animals, the agreement observed between the tests for the detection of antibodies against the ApxIV toxin and against the OmpA protein is very high, as well as the agreement of the test for the detection of antibodies against the ApxII toxin with the rest of the tests is very low. The observed results suggest that the best strategy to assess the situation of a farm concerning *A. pleuropneumoniae* is the combination of several serological tests against different antigens.

Finally, with the established prophylactic protocol, no seroconversion of the animals was detected with any of the tests carried out at least until the 18th week, being able to establish the success of this to avoid the contagion of the animals until approximately the 14th week of age.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abul-Milh, M., Paradis, S. É., Dubreuil, J. D., & Jacques, M. (1999). Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infection and Immunity*, 67(10), 4983–4987.
<https://doi.org/10.1128/iai.67.10.4983-4987.1999>
- Angen, Andreasen, M., Nielsen, E. O., Stockmarr, A., & Bækbo, P. (2008). Effect of tulathromycin on the carrier status of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in the tonsils of pigs. *The Veterinary Record*, 163(15), 445–447.
<https://doi.org/10.1136/VR.163.15.445>
- Antenucci, F., Fougeroux, C., Bossé, J. T., Magnowska, Z., Roesch, C., Langford, P., Holst, P. J., & Bojesen, A. M. (2017). Identification and characterization of serovar-independent immunogens in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*, 48(1).
<https://doi.org/10.1186/s13567-017-0479-5>
- Antenucci, F., Fougeroux, C., Deeney, A., Ørskov, C., Rycroft, A., Holst, P. J., & Bojesen, A. M. (2018). In vivo testing of novel vaccine prototypes against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*, 49(1).
<https://doi.org/10.1186/s13567-017-0502-x>
- Antenucci, F., Magnowska, Z., Nimtz, M., Roesch, C., Jänsch, L., & Bojesen, A. M. (2019). Immunoproteomic characterization of outer membrane vesicles from hyper-vesiculating *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 235, 188–194.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.001>
- Antenucci, F., Ovsepian, A., Wrobel, A., Winther-Larsen, H. C., & Bojesen, A. M. (2020). Design and characterization of a novel tool for the antigenic enrichment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane. *Pathogens*, 9(12), 1–13.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9121014>
- Aper, D., Frömbling, J., Bağcıoğlu, M., Ehling-Schulz, M., & Hennig-Pauka, I. (2020). Comparison of metabolic adaptation and biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates from the upper and lower respiratory tract of swine with respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, 240.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108532>
- Archambault, M., Harel, J., Gouré, J., Tremblay, Y. D. N., & Jacques, M. (2012). Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Drug Resistance*, 18(2), 198–206.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2011.0150>
- Arruda, L. P., Malcher, C., Petri, F. A. M., da Silva, D. G., Storino, G. Y., Almeida, H. M. de S., Sonalio, K., Toledo, L. T., & de Oliveira, L. G. (2024). Pathological analysis and etiological assessment of pulmonary lesions and its association with pleurisy in slaughtered pigs. *Veterinary Microbiology*, 110039.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110039>
- Assavacheep, P., & Rycroft, A. N. (2013). Survival of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outside the pig. *Research in Veterinary Science*, 94(1), 22–26.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.024>

- Baarsch, M. J., Foss, D. L., & Murtaugh, M. P. (2000). Pathophysiologic correlates of acute porcine pleuropneumonia. *American Journal of Veterinary Research*, 61(6), 684–690. <https://doi.org/10.2460/AJVR.2000.61.684>
- Baarsch, M. J., Scamurra, R. W., Burger, K., Foss, D. L., Maheswaran, S. K., & Murtaugh, M. P. (1995). Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, 63(9), 3587–3594. <https://doi.org/10.1128/iai.63.9.3587-3594.1995>
- Balasz, M., Fort, M., Taylor, L. P., & Calvert, J. G. (2018). Vaccination of 1-day-old pigs with a porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) modified live attenuated virus vaccine is able to overcome maternal immunity. *Porcine Health Management*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0101-x>
- Baltes, N., Hennig-Pauka, I., & Gerlach, G. F. (2002). Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 283–287. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00570-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00570-0)
- Baltes, N., Hennig-Pauka, I., Jacobsen, I., Gruber, A. D., & Gerlach, G. F. (2003). Identification of dimethyl sulfoxide reductase in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its role in Infection. *Infection and Immunity*, 71(12), 6784–6792. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.6784-6792.2003>
- Bandrick, M., Ariza-Nieto, C., Baidoo, S. K., & Molitor, T. W. (2014a). Colostral antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(1), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.11.005>
- Bandrick, M., Theis, K., & Molitor, T. W. (2014b). Maternal immunity enhances *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination induced cell-mediated immune responses in piglets. *Veterinary Research*, 10. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-124>
- Baraldi, T. G., Cruz, N. R. N., Pereira, D. A., Galdeano, J. V. B., Gatto, I. R. H., Silva, A. F. D., Panzardi, A., Linhares, D. C. L., Mathias, L. A., & de Oliveira, L. G. (2019). Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and influenza virus and their relationships with risk factors, clinical signs and lung lesions in pig farms with one-site production systems in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 171. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104748>
- Beck, M., Van den Bosch, J. F., Jongenelen, I. M. C. A., Loeffen, P. L. W., Nielsen, R., Nicolet, J., & Frey, J. (1994). RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2749–2754. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.11.2749-2754.1994>
- Belanger, M., Begin, C., & Jacques, M. (1995). Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infection and Immunity*, 63(2), 656–662. <https://doi.org/10.1128/iai.63.2.656-662.1995>
- Belanger, M., Debreuil, D., Harel, J., Girard, C., & Jacques, M. (1990). Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal

- rings. *Infection and Immunity*, 58(11), 3523–3530.
<https://doi.org/10.1128/iai.58.11.3523-3530.1990>
- Belanger, M., Dubreuil, D., & Jacques, M. (1994). Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, 62(3), 868–873.
<https://doi.org/10.1128/iai.62.3.868-873.1994>
- Bercier, P., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2019). Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on barrier function and inflammatory response of pig tracheal epithelial cells. *Pathogens and Disease*, 77(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1093/femspd/fty079>
- Berger, S. S., Lauritsen, K. T., Boas, U., Lind, P., & Andresen, L. O. (2017). Simultaneous detection of antibodies to five *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars using bead-based multiplex analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(6), 797–804.
<https://doi.org/10.1177/1040638717719481>
- Bertram, T. A. (1988). Pathobiology of acute pulmonary lesions in swine infected with *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Canadian Veterinary Journal*, 29(7), 574–577.
- Beskow, P., Norqvist, M., & Wallgren, P. (1998). Relationships between selected climatic factors in fattening units and their influence on the development of respiratory diseases in swine. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 39(1), 49–60.
<https://doi.org/10.1186/BF03547806>
- Beynon, L. M., Richards, J. C., & Perry, M. B. (1991). Structure of the capsular polysaccharide from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10. *Carbohydrate Research*, 220(C), 185–193.
[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(91\)80016-G](https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)80016-G)
- Blondeau, J. M., & Fitch, S. D. (2019). Mutant prevention and minimum inhibitory concentration drug values for enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin and tulathromycin tested against swine pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis*. *PLoS ONE*, 14(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210154>
- Boekema, B. K. H. L., Kamp, E. M., Smits, M. A., Smith, H. E., & Stockhofe-Zurwieden, N. (2004a). Both ApXI and ApXII of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 are necessary for full virulence. *Veterinary Microbiology*, 100(1–2), 17–23.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.09.024>
- Boekema, B. K. H. L., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H. E., Kamp, E. M., Van Putten, J. P., & Verheijden, J. H. (2003). Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 93(2), 133–144.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00020-8)
- Boekema, B. K. H. L., Van Putten, J. P. M., Stockhofe-Zurwieden, N., & Smith, H. E. (2004b). Host Cell Contact-Induced Transcription of the Type IV Fimbria Gene Cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, 72(2), 691–700.
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.691-700.2004>

- Boersma, W. J. A., Van Rooij, E. M. A., Scholten, J. W., Zwart, R. J., Bianchi, A., & Kimman, T. G. (1998). Silent memory induction in maternal immune young animals. *Veterinary Quarterly*, *20*, 89–92.
<https://doi.org/10.1080/01652176.1998.9694979>
- Bonilla, M. C., Quiros, O. N., Wendt, M., Hennig-Pauka, I., Mörgelin, M., von Köckritz-Blickwede, M., & de Buhr, N. (2022). New insights into neutrophil extracellular trap (NETs) formation from porcine neutrophils in response to bacterial infections. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(16).
<https://doi.org/10.3390/ijms23168953>
- Bossé, J. T., Gilmour, H. D., & MacInnes, J. I. (2001). Novel genes affecting urease activity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, *183*(4), 1242–1247.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1242-1247.2001>
- Bossé, J. T., Janson, H., Sheehan, B. J., Beddek, A. J., Rycroft, A. N., Simon Kroll, J., & Langford, P. R. (2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection*, *4*(2), 225–235.
[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01534-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01534-9)
- Bossé, J. T., Johnson, R. P., Nemec, M., & Rosendal, S. (1991). Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infection and Immunity*, *60*(2), 479–484.
<https://doi.org/10.1128/iai.60.2.479-484.1992>
- Bossé, J. T., Li, Y., Fernandez Crespo, R., Lacouture, S., Gottschalk, M., Sárközi, R., Fodor, L., Casas Amoribieta, M., Angen, Ø., Nedbalcova, K., Holden, M. T. G., Maskell, D. J., Tucker, A. W., Wren, B. W., Rycroft, A. N., & Langford, P. R. (2018a). Comparative sequence analysis of the capsular polysaccharide loci of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1–18, and development of two multiplex PCRs for comprehensive capsule typing. *Veterinary Microbiology*, *220*, 83–89.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.011>
- Bossé, J. T., Li, Y., Rogers, J., Crespo, R. F., Li, Y., Chaudhuri, R. R., Holden, M. T. G., Maskell, D. J., Tucker, A. W., Wren, B. W., Rycroft, A. N., Langford, P. R., Tucker, A. W., Peters, S. E., Weinert, L. A., Wang, J., Luan, S. L., Maglennon, G. A., Beddow, J.,... Terra, V. S. (2017). Whole genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, *8*(3).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00311>
- Bossé, J. T., Li, Y., Sárközi, R., Fodor, L., Lacouture, S., Gottschalk, M., Casas Amoribieta, M., Angen, Ø., Nedbalcova, K., Holden, M. T. G., Maskell, D. J., Tucker, A. W., Wren, B. W., Rycroft, A. N., & Langford, P. R. (2018b). Proposal of serovars 17 and 18 of *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on serological and genotypic analysis. *Veterinary Microbiology*, *217*(2), 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.019>
- Bossé, J. T., & MacInnes, J. I. (2000). Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *64*(3), 145–150.

- Bouma, A., De Jong, M. C. M., & Kimman, T. G. (1997). The influence of maternal immunity on the transmission of pseudorabies virus and on the effectiveness of vaccination. *Vaccine*, *15*(3), 287–294.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00179-X)
- Bourne, F. J., & Curtis, J. (1973). The transfer of immunoglobins IgG, IgA and IgM from serum to colostrum and milk in the sow. In *Immunology*.
- Broes, A., Martineau, G.-P., & Gottschalk, M. (2007). Dealing with unexpected *Actinobacillus pleuropneumoniae* serological results. *Journal of Swine Health and Production*, *15*(5), 264–269.
- Brogaard, L., Klitgaard, K., Heegaard, P. M. H., Hansen, M. S., Jensen, T. K., & Skovgaard, K. (2015). Concurrent host-pathogen gene expression in the lungs of pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Genomics*, *16*(1).
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-1557-6>
- Buettner, F. F. R., Konze, S. A., Maas, A., & Gerlach, G. F. (2011). Proteomic and immunoproteomic characterization of a DIVA subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Proteome Science*, *9*.
<https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-23>
- Cao, Y., Gao, L., Zhang, L., Zhou, L., Yang, J., Deng, L., Zhao, J., Qi, C., & Liu, J. (2020). Genome-wide screening of lipoproteins in *Actinobacillus pleuropneumoniae* identifies three antigens that confer protection against virulent challenge. *Scientific Reports*, *10*(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58968-7>
- Chang, N. Y., Chen, Z. W., Chen, T. H., Liao, J. W., Lin, C. C., Chien, M. S., Lee, W. C., Lin, J. H., & Hsuan, S. L. (2014). Elucidating the role of Apxl in hemolysis and cellular damage by using a novel apxA mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10. *Journal of Veterinary Science*, *15*(1), 81–89.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.1.81>
- Cheong, Y., Oh, C., Lee, K., & Cho, K. H. (2017). Survey of porcine respiratory disease complex-associated pathogens among commercial pig farms in Korea via oral fluid method. *Journal of Veterinary Science*, *18*(3), 283–289.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.3.283>
- Chien, M. S., Chan, Y. Y., Chen, Z. W., Wu, C. M., Liao, J. W., Chen, T. H., Lee, W. C., Yeh, K. S., & Hsuan, S. L. (2009). *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived Apxl induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology*, *135*(3–4), 327–333.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.071>
- Chiers, K., De Waele, T., Pasmans, F., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2010). Virulence factors of *Actinobacillus pleuropneumoniae* involved in colonization, persistence and induction of lesions in its porcine host. *Veterinary Research*, *41*(5).
<https://doi.org/10.1051/vetres/2010037>
- Chiers, K., Donné, E., Van Overbeke, I., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2002a). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Veterinary Microbiology*, *85*(4), 343–352.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00518-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00518-1)

- Chiers, K., Donné, E., Van Overbeke, I., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2002b). Evaluation of serology, bacteriological isolation and polymerase chain reaction for the detection of pigs carrying *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract after experimental infection. *Veterinary Microbiology*, *88*(4), 385–392.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00150-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00150-5)
- Chiers, K., Haesebrouck, F., Van Overbeke, I., Charlier, G., & Ducatelle, R. (1999). Early in vivo interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Veterinary Microbiology*, *68*(3–4), 301–306.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00048-6)
- Chuekwon, K., Chu, C. Y., & Cheng, L. T. (2022). N-terminus of flagellin enhances vaccine efficacy against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*, *18*(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03380-8>
- Chung, J. W., Küster-Schöck, E., Gibbs, B. F., Jacques, M., & Coulton, J. W. (2012). Immunoproteomic analyses of outer membrane antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* grown under iron-restricted conditions. *Veterinary Microbiology*, *159*(1–2), 187–194.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.038>
- Chung, J. W., Ng-Thow-Hing, C., Budman, L. I., Gibbs, B. F., Nash, J. H. E., Jacques, M., & Coulton, J. W. (2007). Outer membrane proteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: LC-MS/MS analyses validate in silico predictions. *Proteomics*, *7*(11), 1854–1865.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200600979>
- Costa, G., Oliveira, S., Torrison, J., & Dee, S. (2011). Evaluation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* diagnostic tests using samples derived from experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology*, *148*(2–4), 246–251.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.023>
- Crujisen, T., Van Leengoed, L. A. M. G., Dekker-Nooren, T. C. E. M., Schoevers, E. J., & Verheijden, J. H. M. (1992). Phagocytosis and killing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes isolated from pigs. *Infection and Immunity*, *60*(11), 4867–4871.
<https://doi.org/10.1128/iai.60.11.4867-4871.1992>
- Crujisen, T., Van Leengoed, L. A., Kamp, E. M., Hunneman, W. A., Riepema, K., Bartelse, A., & Verheijden, J. H. (1995a). Prevalence and development of antibodies neutralizing the haemolysin and cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in three infected pig herds. *The Veterinary Quarterly*, *17*(3), 96–100.
<https://doi.org/10.1080/01652176.1995.9694541>
- Crujisen, T., Van Leengoed, L. A. M. G., Ham-Hoffies, M., & Verheijden, J. H. M. (1995b). Convalescent pigs are protected completely against infection with a homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain but incompletely against a heterologous-serotype strain. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 63, Issue 6).
<https://doi.org/10.1128/iai.63.6.2341-2343.1995>
- Crujisen, T., Van Leengoed, L. A. M. G., Kamp, E. M., Bartelse, A., Korevaar, A., & Verheijden, J. H. M. (1995c). Susceptibility to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs from an endemically infected herd is related to the presence of toxin-neutralizing antibodies.

- Veterinary Microbiology*, 47(3–4), 219–228.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00109-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00109-3)
- Cullen, J. M., & Rycroft, A. N. (1994). Phagocytosis by pig alveolar macrophages of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 mutant strains defective in haemolysin II (ApxII) and pleurotoxin (ApxIII). *Microbiology*, 140(2), 237–244.
<https://doi.org/10.1099/13500872-140-2-237>
- Curtis, J., & Bourne, F. J. (1971). Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 236(1), 319–332.
[https://doi.org/10.1016/0005-2795\(71\)90181-4](https://doi.org/10.1016/0005-2795(71)90181-4)
- Czyzewska-Dors, E., Dors, A., Kwit, K., Stasiak, E., & Pomorska-Mól, M. (2017). Pig lung immune cytokine response to the swine influenza virus and the *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Journal of Veterinary Research*, 61(3), 259–265.
<https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0036>
- Daniłowicz, E., Martinez-Arias, R., Dolf, G., Singh, M., Probst, I., Tümmler, B., Höltig, D., Waldmann, K. H., Gerlach, G. F., Stanke, F., & Leeb, T. (2010). Characterization of the porcine transferrin gene (TF) and its association with disease severity following an experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Animal Genetics*, 41(4), 424–427.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.02012.x>
- Dayao, D. A. E., Dawson, S., Kienzle, M. J. P., Gibson, J. S., Blackall, P. J., & Turni, C. (2015). Variation in the antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates in a pig, within a batch of pigs, and among batches of pigs from one farm. *Microbial Drug Resistance*, 21(4), 491–496.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0265>
- de Buhr, N., Bonilla, M. C., Pfeiffer, J., Akhdar, S., Schwennen, C., Kahl, B. C., Waldmann, K. H., Valentin-Weigand, P., Hennig-Pauka, I., & von Köckritz-Blickwede, M. (2019). Degraded neutrophil extracellular traps promote the growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell Death and Disease*, 10(9).
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1895-4>
- Desrosiers, R., & Moore, C. (1998). Indirect transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production*, 6(6), 263–265.
- Devenish, J., Rosendal, S., & Bossé, J. T. (1990). Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, 58(12), 3829–3832.
<https://doi.org/10.1128/IAI.58.12.3829-3832.1990>
- Devenish, J., Rosendal, S., Johnson, R., & Hubler, S. (1989). Immunoserological comparison of 104-kilodalton proteins associated with hemolysis and cytolysis in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Pasteurella haemolytica*, and *Escherichia coli*. *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 57, Issue 10).
<https://doi.org/10.1128/iai.57.10.3210-3213.1989>

- Diarra, M. S., Dolence, J. A., Dolence, E. K., Darwish, I., Miller, M. J., Malouin, F., & Jacques, M. (1996). Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is promoted by exogenous hydroxamate and catechol siderophores. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(3), 853–859.
<https://doi.org/10.1128/aem.62.3.853-859.1996>
- Dom, P., & Haesebrouck, F. (1992). Comparative Virulence of NAD-Dependent and NAD-Independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains. *J. Vet. Med.*, *39*, 303–306.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1992.tb01173.x>
- Dom, P., Haesebrouck, F., & De Baetselier, P. (1992a). Stimulation and suppression of the oxygenation activity of porcine pulmonary alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites. *American Journal of Veterinary Research*, *53*(7), 1113–1118.
<https://doi.org/10.2460/ajvr.1992.53.7.1113>
- Dom, P., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., & Charlier, G. (1994). In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infection and Immunity*, *62*(4), 1262–1267.
<https://doi.org/10.1128/iai.62.4.1262-1267.1994>
- Dom, P., Haesebrouck, F., Kamp, E. M., & Smits, M. A. (1992b). Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolysins on porcine neutrophil chemiluminescence. *Infection and Immunity*, *60*(10), 4328–4334.
<https://doi.org/10.1128/iai.60.10.4328-4334.1992>
- Dong, Z., Zhou, X. Z., Sun, J. chao, Meng, X. Bin, Li, H. S., Cheng, F. S., Wei, X. J., Li, B., Wang, W. W., & Zhang, J. Y. (2020). Efficacy of enteric-coated tilmicosin granules in pigs artificially infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Veterinary Medicine and Science*, *6*(1), 105–113.
<https://doi.org/10.1002/vms3.198>
- Dorey, L., Hobson, S., & Lees, P. (2017a). Factors influencing the potency of marbofloxacin for pig pneumonia pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*. *Research in Veterinary Science*, *111*, 93–98.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.11.011>
- Dorey, L., Pelligand, L., & Lees, P. (2017b). Prediction of marbofloxacin dosage for the pig pneumonia pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* by pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. *Veterinary Research*, *13*(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1128-y>
- Dreyfus, A., Schaller, A., Nivollet, S., Segers, R. P. A. M., Kobisch, M., Mieli, L., Soerensen, V., Hüßy, D., Miserez, R., Zimmermann, W., Inderbitzin, F., & Frey, J. (2004). Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Veterinary Microbiology*, *99*(3–4), 227–238.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.01.004>
- Dubreuil, J. D., Jacques, M., Mittal, K. R., & Gottschalk, M. (2000). *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*,

- 1(2), 73–93.
<https://doi.org/10.1017/S1466252300000074>
- Dunlop, H., & Mcorist, S. (2021). Serologic monitoring of herds with and without bacterin vaccination for *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production*, 29(1), 29–36.
- Eamens, G. J., Gonsalves, J., Whittington, A. M., & Turner, B. (2012a). Evaluation of serovar-independent ELISA antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs following vaccination or experimental challenge with respiratory pathogens and natural *A. pleuropneumoniae* serovar 1 challenge. *Australian Veterinary Journal*, 90(12), 490–498.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2012.01008.x>
- Eamens, G. J., Gonsalves, J. R., Whittington, A. M., & Turner, B. (2012b). Evaluation of serovar-independent ELISA antigens of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs, following experimental challenge with *A. pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida*. *Australian Veterinary Journal*, 90(6), 225–234.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2012.00934.x>
- Fablet, C., Marois, C., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J. P., Le Devendec, L., Kobisch, M., Madec, F., & Rose, N. (2012a). Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 627–630.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.11.002>
- Fablet, C., Marois-Créhan, C., Simon, G., Grasland, B., Jestin, A., Kobisch, M., Madec, F., & Rose, N. (2012b). Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. *Veterinary Microbiology*, 157(1–2), 152–163.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.015>
- Fablet, C., Renson, P., Eono, F., Mahé, S., Eveno, E., Le Dimna, M., Normand, V., Lebreton, A., Rose, N., & Bourry, O. (2016). Maternally-derived antibodies (MDAs) impair piglets' humoral and cellular immune responses to vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Veterinary Microbiology*, 192, 175–180.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.014>
- Faldyna, M., Nechvatalova, K., Sinkora, J., Knotigova, P., Leva, L., Krejci, J., & Toman, M. (2005). Experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in piglets with different types and levels of specific protection: Immunophenotypic analysis of lymphocyte subsets in the circulation and respiratory mucosal lymphoid tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 107(1–2), 143–152.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.04.007>
- Feng, H., Segalés, J., Fraile, L., López-Soria, S., & Sibila, M. (2016). Effect of high and low levels of maternally derived antibodies on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection dynamics and production parameters in PCV2 vaccinated pigs under field conditions. *Vaccine*, 34(27), 3044–3050.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.088>
- Fenwick, B. W., & Osburn, B. I. (1986). Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs. *Infection and Immunity*, 54(2), 575–582.
<https://doi.org/10.1128/IAI.54.2.575-582.1986>

- Fenwick, B. W., Osburn, B. I., & Olander, H. J. (1986). Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *American Journal of Veterinary Research*, 47(7), 1433–1441.
- Ferreira Barbosa, J. A., Labrie, J., Beaudry, F., Gagnon, C. A., & Jacques, M. (2015). *Actinobacillus pleuropneumoniae* induces SJPL cell cycle arrest in G2/M-phase and inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication. *Virology Journal*, 12(1).
<https://doi.org/10.1186/s12985-015-0404-3>
- Fiers, J., Maes, D., Cay, A. B., Vandebussche, F., Mostin, L., Parys, A., & Tignon, M. (2024). PRRSV-vaccinated, seronegative sows and maternally derived antibodies (II): Impact on PRRSV-1 vaccine effectiveness and challenge outcomes in piglets. *Vaccines*, 12(3).
<https://doi.org/10.3390/vaccines12030257>
- Fiers, J., Tignon, M., Maes, D., & Cay, A. B. (2023). Follow-Up of PRRSV-vaccinated piglets born from PRRSV-vaccinated, ELISA-Seropositive and ELISA-seronegative. *Viruses*, 15(2).
<https://doi.org/10.3390/v15020479>
- Figueras-Gourgues, S., Fraile, L., Segalés, J., Hernández-Caravaca, I., López-Úbeda, R., García-Vázquez, F. A., Gomez-Duran, O., & Grosse-Liesner, B. (2019). Effect of Porcine circovirus 2 (PCV-2) maternally derived antibodies on performance and PCV-2 viremia in vaccinated piglets under field conditions. *Porcine Health Management*, 5(1).
<https://doi.org/10.1186/s40813-019-0128-7>
- Fittipaldi, N., Broes, A., Harel, J., Kobisch, M., & Gottschalk, M. (2003). Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5085–5093.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5085-5093.2003>
- Fittipaldi, N., Klopfenstein, C., Gottschalk, M., Broes, A., Paradis, M. A., & Dick, C. P. (2005). Assessment of the efficacy of tilmicosin phosphate to eliminate *Actinobacillus pleuropneumoniae* from carrier pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 69(2), 146.
- Fitzgerald, R. M., O’Shea, H., Manzanilla, E. G., Moriarty, J., McGlynn, H., & Calderón Díaz, J. A. (2020). Associations between animal and herd management factors, serological response to three respiratory pathogens and pluck lesions in finisher pigs on farrow-to-finish farms. *Porcine Health Management*, 6(34).
<https://doi.org/10.1186/s40813-020-00173-z>
- Fort, M., Sibila, M., Pérez-Martín, E., Nofrarías, M., Mateu, E., & Segalés, J. (2009). One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine*, 27(30), 4031–4037.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.028>
- Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarías, M., & Segalés, J. (2010). Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Veterinary Journal*, 184(3), 326–333.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.029>

- Fraile, L., Grau-Roma, L., Sarasola, P., Sinovas, N., Nofrarías, M., López-Jimenez, R., López-Soria, S., Sibila, M., & Segalés, J. (2012). Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: Improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine*, *30*(11), 1986–1992.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.008>
- Frey, J. (1995). Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends in Microbiology*, *3*(7), 257–261.
[https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88939-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88939-8)
- Frey, J. (2011). The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*. *Veterinary Microbiology*, *153*(1–2), 51–58.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.018>
- Frey, J. (2019). RTX toxins of animal pathogens and their role as antigens in vaccines and diagnostics. *Toxins* (Vol. 11, Issue 12).
<https://doi.org/10.3390/toxins11120719>
- Frey, J., Bossé, J. T., Chang, Y. F., Cullen, J. M., Fenwick, B., Gerlach, G. F., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T. J., Jansen, R., Kamp, E. M., MacDonald, J., MacInnes, J. I., Mittal, K. R., Nicolet, J., Rycroft, A. N., Segers, R. P. A. M., Smits, M. A., & Stenbaek, E. (1993). *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: Uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *Journal of General Microbiology*, *139*(8), 1723–1728.
<https://doi.org/10.1099/00221287-139-8-1723>
- Furesz, S. E., Mallard, B. A., Bossé, J. T., Rosendal, S., Wilkie, B. N., & MacInnes, J. I. (1997). Antibody-and cell-mediated immune responses of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected and bacterin-vaccinated pigs. *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 65, Issue 2).
<https://doi.org/10.1128/iai.65.2.358-365.1997>
- Galdeano, J. V. B., Baraldi, T. G., Ferraz, M. E. S., De Souza Almeida, H. M., Mechler-Dreibi, M. L., Costa, W. M. T., Montassier, H. J., Mathias, L. A., & De Oliveira, L. G. (2019). Cross-sectional study of seropositivity, lung lesions and associated risk factors of the main pathogens of Porcine Respiratory Diseases Complex (PRDC) in Goiás, Brazil. *Porcine Health Management*, *5*(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s40813-019-0130-0>
- Ganeshapillai, J., Boncheff, A. G., Slavic, D., MacInnes, J., & Monteiro, M. A. (2011). The lipopolysaccharide core of *Actinobacillus suis* and its relationship to those of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Biochemistry and Cell Biology*, *89*(3), 351–358.
<https://doi.org/10.1139/o11-003>
- Giebels, F., Geissbühler, U., Oevermann, A., Grahofer, A., Olias, P., Kuhnert, P., Maiolini, A., & Stein, V. M. (2020). Vertebral fracture due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* osteomyelitis in a weaner. *Veterinary Research*, *16*(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02656-1>
- Giménez-Lirola, L. G., Jiang, Y. H., Sun, D., Hoang, H., Yoon, K. J., Halbur, P. G., & Opriessnig, T. (2014). Simultaneous detection of antibodies against Apx toxins ApxI, ApxII, ApxIII, and ApxIV in pigs with known and unknown *Actinobacillus pleuropneumoniae* exposure using

- a multiplexing liquid array platform. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(1), 85–95.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00451-13>
- Gómez-Laguna, J., Islas, A., Muñoz, D., Ruiz, Á., Villamil, A., Carrasco, L., & Quezada, M. (2014). Infection dynamics and acute phase response of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolate of moderate virulence in pigs. *Veterinary Microbiology*, 173(3–4), 332–339.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.015>
- Gonzalez, G. C., Caamano, D. L., & Schryvers, A. S. (1990). Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 4(7), 1173–1179.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00692.x>
- González, W., Giménez-Lirola, L. G., Holmes, A., Lizano, S., Goodell, C., Poonsuk, K., Sitticharoenchai, P., Sun, Y., & Zimmerman, J. (2017). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIV toxin antibody in serum and oral fluid specimens from pigs inoculated under experimental conditions. *Journal of Veterinary Research*, 61(2), 163–171.
<https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0021>
- Gottschalk, M. (2015). The challenge of detecting herds sub-clinically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Journal*, 206(1), 30–38.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.06.016>
- Gottschalk, M. (2017). Distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs. *Canadian Veterinary Journal*, 58(8), 802–804.
<https://doi.org/10.1016/j.trjl.2015.06.016>
- Gottschalk, M., & Broes, A. (2019). Actinobacillosis. *Diseases of Swine* (pp. 749–766). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch48>
- Gottschalk, M., Broes, A., Mittal, K. R., Kobisch, M., Kuhnert, P., Lebrun, A., & Frey, J. (2003). Non-pathogenic *Actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: A novel species? *Veterinary Microbiology*, 92(1–2), 87–101.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00341-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00341-3)
- Gottschalk, M., & Lacouture, S. (2015). Canada: Distribution of *Streptococcus suis* (from 2012 to 2014) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (from 2011 to 2014) serotypes isolated from diseased pigs. *The Canadian Veterinary Journal*, 56(10), 1093.
<https://doi.org/10.1016/J.TRJL.2015.06.016>
- Gram, T., Ahrens, P., Andreasen, M., & Nielsen, J. P. (2000). An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the apx and omlA genes - evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Veterinary Microbiology*, 75(1), 43–57.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00206-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00206-6)
- Grandemange, E., Perrin, P. A., Cvejic, D., Haas, M., Rowan, T., & Hellmann, K. (2017). Randomised controlled field study to evaluate the efficacy and clinical safety of a single 8 mg/kg injectable dose of marbofloxacin compared with one or two doses of 7.5 mg/kg injectable enrofloxacin for the treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections

- in growing-fattening pigs in Europe. *Porcine Health Management*, 3.
<https://doi.org/10.1186/s40813-017-0057-2>
- Guarneri, F., Romeo, C., Scali, F., Zoppi, S., Formenti, N., Maisano, A. M., Catania, S., Gottschalk, M., & Alborali, G. L. (2024). Serotype diversity and antimicrobial susceptibility profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Italian pig farms from 2015 to 2022. *Veterinary Research*, 55(1), 48.
<https://doi.org/10.1186/s13567-024-01305-x>
- Guitart-Matas, J., Gonzalez-Escalona, N., Maguire, M., Vilaró, A., Martinez-Urtaza, J., Fraile, L., & Migura-Garcia, L. (2022). Revealing genomic insights of the unexplored porcine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* using whole genome sequencing. *Microbiology Spectrum*, 10(4).
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01185-22>
- Guo, F., Quan, R., Cui, Y., Cao, X., Wen, T., & Xu, F. (2023). Effects of OxyR regulator on oxidative stress, Apx toxin secretion and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1324760>
- Gutierrez, C. B., Rodriguez-Barbosa, J. I., Suarez, J., Tascon, R. I., & Rodriguez-Ferri, E. F. (1993). Evaluation of an immunoperoxidase technique using an only biotin-labeled antibody for the demonstration of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in tissue sections. *Journal of Veterinary Medicine*, 40(1–10), 81–88.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1993.tb00113.x>
- Gutiérrez-Martín, C. B., Blanco, N. G. del, Blanco, M., Navas, J., & Rodríguez-Ferri, E. F. (2006). Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Veterinary Microbiology*, 115(1–3), 218–222.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.12.014>
- Guzman-Bautista, E. R., Garcia-Ruiz, C. E., Gama-Espinosa, A. L., Ramirez-Estudillo, C., Rojas-Gomez, O. I., & Vega-Lopez, M. A. (2014). Effect of age and maternal antibodies on the systemic and mucosal immune response after neonatal immunization in a porcine model. *Immunology*, 141(4), 609–616.
<https://doi.org/10.1111/imm.12222>
- Haake, M., Palzer, A., Rist, B., Weissenbacher-Lang, C., Fachinger, V., Eggen, A., Ritzmann, M., & Eddicks, M. (2014). Influence of age on the effectiveness of PCV2 vaccination in piglets with high levels of maternally derived antibodies. *Veterinary Microbiology*, 168(2–4), 272–280.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.012>
- Haesebrouck, F., Chiers, K., Van Overbeke, I., & Ducatelle, R. (1997). *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: The role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology*, 58(2–4), 239–249.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00162-4)
- Haesebrouck, F., Van De Kerkhof, A., Dom, P., Chiers, K., & Ducatelle, R. (1996). Cross-protection between *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotypes-serotypes in pigs. *Veterinary microbiology*, 52.

- Hälli, O., Haimi-Hakala, M., Oliviero, C., & Heinonen, M. (2020). Herd-level risk factors for chronic pleurisy in finishing pigs: A case-control study. *Porcine Health Management*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00156-0>
- Hart, F. J., Kilgore, R. W., Meinert, T. R., Nutsch, R. G., Sunderland, S. J., & Lechtenberg, K. F. (2006). Efficacy of tulathromycin in the treatment of respiratory disease in pigs caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Record*, 158(13), 433–436. <https://doi.org/10.1136/vr.158.13.433>
- Hathroubi, S., Hancock, M. A., Bossé, J. T., Langford, P. R., Tremblay, Y. D. N., Labrie, J., & Jacques, M. (2015). Surface polysaccharide mutants reveal that absence of O antigen reduces biofilm formation of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, 84(1), 127–137. <https://doi.org/10.1128/IAI.00912-15>
- Hedegaard, J., Skovgaard, K., Mortensen, S., Sørensen, P., Jensen, T. K., Hornshøj, H., Bendixen, C., & Heegaard, P. M. H. (2007). Molecular characterisation of the early response in pigs to experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* using cDNA microarrays. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1). <https://doi.org/10.1186/1751-0147-49-11>
- Heegaard, P. M. H., Klausen, J., Nielsen, J. P., González-Ramón, N., Piñeiro, M., Lampreave, F., & Alava, M. A. (1998). The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-Reactive Protein, Major Acute Phase protein and Serum Amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Biochem. Physiol*, 119(2). [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00362-3](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00362-3)
- Hernández Castro, R., Chávez Gris, G., & Gutiérrez Pabelli, J. Á. (2002). Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1, serotype 1 from pig lungs with and without pneumonic lesions using an immunohistochemical technique. *Veterinaria México OA*, 33(4), 355–3623. <https://doi.org/10.21753/VMOA.33.004.77>
- Hernández-Cuellar, E., Guerrero-Barrera, A. L., Avelar-González, F. J., Díaz, J. M., Chávez-Reyes, J., & Salazar De Santiago, A. (2022). Adhesion mechanisms of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to the porcine respiratory system and biofilm formation. *Austral J Vet Sci*, 54 <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-81322022000300093>
- Hoeltig, D., Hennig-Pauka, I., Thies, K., Rehm, T., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., Gerlach, G. F., & Waldmann, K. H. (2009). A novel Respiratory Health Score (RHS) supports a role of acute lung damage and pig breed in the course of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Veterinary Research*, 5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-14>
- Hoeltig, D., Rohde, J., Frase, R., Nietfeld, F., Waldmann, K. H., Valentin-Weigand, P., & Meens, J. (2018). Multi-organ spreading of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 7 in weaned pigs during the first week after experimental infection. *Veterinary Research*, 49(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0592-0>
- Holmer, I., Salomonsen, C. M., Jorsal, S. E., Astrup, L. B., Jensen, V. F., Høgg, B. B., & Pedersen, K. (2019). Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic

- usage. *Veterinary Research*, 15(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-019-2162-8>
- Holmgren, N., Lundeheim, N., & Wallgren, P. (1999). Infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* in fattening pigs. Influence of piglet production systems and influence on production parameters. *Journal of Veterinary Medicine*, 46(8), 535–544.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1999.tb01246.x>
- Hölzen, P., Warnck, T., Hoy, S., Schlegel, K., Hennig-Pauka, I., & Gaumann, H. (2021). Comparison of protectivity and safety of two vaccines against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a field study. *Agriculture*, 11(11).
<https://doi.org/10.3390/agriculture11111143>
- Hsu, C. W., Li, S. C., Chang, N. Y., Chen, Z. W., Liao, J. W., Chen, T. H., Wang, J. P., Lin, J. H., & Hsuan, S. L. (2016). Involvement of NF- κ B in regulation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin ApxI-induced proinflammatory cytokine production in porcine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology*, 195, 128–135.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.09.020>
- Hu, Y., Jiang, C., Zhao, Y., Cao, H., Ren, J., Zeng, W., Zhang, M., Li, Y., He, Q., & Li, W. (2023). TurboID screening of ApxI toxin interactants identifies host proteins involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae*-induced apoptosis of immortalized porcine alveolar macrophages. *Veterinary Research*, 54(1), 62.
<https://doi.org/10.1186/s13567-023-01194-6>
- Huang, H., Potter, A. A., Campos, M., Leighton, F. A., Willson, P. J., Haines, D. M., & Yates, W. D. (1999). Pathogenesis of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae*, part II: roles of proinflammatory cytokines. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 63(1), 69–78.
- Huang, J., Kang, W., Yi, D., Zhu, S., Xiang, Y., Liu, C., Li, H., Dai, D., Su, J., He, J., & Liang, Z. (2024). Intranasal B5 promotes mucosal defence against *Actinobacillus pleuropneumoniae* via ameliorating early immunosuppression. *Virulence*, 15(1).
<https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2316459>
- Hunneman, W. A., & Oving, L. (1991). Studies on the possibility of rearing seronegative animals within a breeding and rearing herd infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Veterinary Quarterly*, 13(3), 172–175.
<https://doi.org/10.1080/01652176.1991.9694303>
- Hur, J., Eo, S. K., Park, S. Y., Choi, Y., & Lee, J. H. (2016). Immunological study of an attenuated *Salmonella typhimurium* expressing ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA and OmpA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a mouse model. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(12), 1693–1696.
<https://doi.org/10.1292/jvms.14-0428>
- Inzana, T. J., Ma, J., Workman, T., Gogolewski, R. P., & Anderson, P. (1988). Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infection and Immunity*, 56(8), 1880–1889.
<https://doi.org/10.1128/iai.56.8.1880-1889.1988>

- Inzana, T. J., Todd, J., & Veit, H. P. (1993). Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infection and Immunity*, *61*(5), 1682–1686.
<https://doi.org/10.1128/IAI.61.5.1682-1686.1993>
- Izano, E. A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Mulks, M. H., Velliyagounder, K., Rangunath, C., Kher, W. B., Ramasubbu, N., Jabbouri, S., Perry, M. B., & Kaplan, J. B. (2007). Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, *43*(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.02.004>
- Jacobsen, I., Hennig-Pauka, I., Baltés, N., Trost, M., & Gerlach, G. F. (2005). Enzymes involved in anaerobic respiration appear to play a role in *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence. *Infection and Immunity*, *73*(1), 226–234.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.226-234.2005>
- Jacobsen, M. J., & Nielsen, J. P. (1995). Development and evaluation of a selective and indicative medium for isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from tonsils. *Veterinary microbiology*, *47*(1-2), 191-197.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00062-F](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00062-F)
- Jacques, M., Aragon, V., & Tremblay, Y. D. N. (2010). Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, *11*(2), 97–121.
<https://doi.org/10.1017/S1466252310000149>
- Jäger, H. C., McKinley, T. J., Wood, J. L. N., Pearce, G. P., Williamson, S., Strugnell, B., Done, S., Habernoll, H., Palzer, A., & Tucker, A. W. (2012). Factors associated with pleurisy in pigs: A case-control analysis of slaughter pig data for England and Wales. *PLoS ONE*, *7*(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029655>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, *20*, 197–216.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Jansen, R., Briaire, J., Kamp, E. M., Gielkens, A. L. J., & Smits, M. A. (1993). Structural analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin I (ApxI) operon. *Infection and Immunity*, *61*(9), 3688–3695.
<https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3688-3695.1993>
- Jarosova, R., Ben Arous, J., Nechvatalova, K., Nedbalcova, K., Hlavova, K., Stepanova, H., Leva, L., Oreskovic, Z., Jan Matiasovic, Versillé, N., Sladek, Z., & Faldyna, M. (2023). Effects of oil-based adjuvants on the immune response of pigs after dermal administration of antigen and evaluation of the immunization level after a subsequent *Actinobacillus pleuropneumoniae* challenge in pigs. *Veterinary Microbiology*, *276*.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109607>
- Jarosova, R., Ondrackova, P., Leva, L., Nedbalcova, K., Vicenova, M., Masek, J., Volf, J., Gebauer, J., Do, T., Guran, R., Sladek, Z., Dominguez, J., & Faldyna, M. (2022). Cytokine expression by CD163+ monocytes in healthy and *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected pigs. *Research in Veterinary Science*, *152*, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.07.015>

- Jeong, J., Kim, S., Park, K. H., Kang, I., Park, S. J., Yang, S., Oh, T., & Chae, C. (2018). Vaccination with a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine at 1-day-old improved growth performance of piglets under field conditions. *Veterinary Microbiology*, 214, 113–124.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.023>
- Jirawattanapong P, Stockhofe-Zurwieden N, van Leengoed L, Binnendijk GWisselink H, Raymakers R, Cruijssen T, van der Peet-Schwering C, & van Nes ANielen M. (2008). Efficacy of a subunit vaccine against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in an endemically infected swine herd. *Journal of Swine Health and Production*, 16(4), 193–199.
<http://dx.doi.org/10.54846/jshap/533>
- Jung, M., Won, H., Shin, M. K., Oh, M. W., Shim, S., Yoon, I., & Yoo, H. S. (2019). Development of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxI, ApxII, and ApxIII-specific ELISA methods for evaluation of vaccine efficiency. *Journal of Veterinary Science*, 20(2), 1–12.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2019.20.e2>
- Kamp, E. M., Popma, J. K., Anakotta, J., & Smits, M. A. (1991). Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, 59(9), 3079–3085.
<https://doi.org/10.1128/iai.59.9.3079-3085.1991>
- Kamp, E. M., Stockhofe-Zurwieden, N., Van Leengoed, L. A. M. G., & Smits, M. (1997). Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infection and Immunity*, 65(10), 4350–4354.
<https://doi.org/10.1128/iai.65.10.4350-4354.1997>
- Kamp, E. M., Vermeulen, T. M. M., Smits, M. A., & Haagsma, J. (1994). Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infection and Immunity*, 62(9), 4063–4065.
<https://doi.org/10.1128/iai.62.9.4063-4065.1994>
- Kaplan, J. B., & Mulks, M. H. (2005). Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 108(1–2), 89–94.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.02.011>
- Karabasil, N., Cobanovic, N., Vucicevic, I., Stajkovic, S., Becskei, Z., Forgách, P., & Aleksic-Kovacevic, S. (2017). Association of the severity of lung lesions with carcass and meat quality in slaughter pigs. *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(3), 354–365.
<https://doi.org/10.1556/004.2017.034>
- Kaspersen, H., Urdahl, A. M., Grøntvedt, C. A., Gulliksen, S. M., Tesfamichael, B., Sletteemås, J. S., Norström, M., & Sekse, C. (2020). *Actinobacillus pleuropneumoniae* eradication with enrofloxacin may lead to dissemination and long-term persistence of quinolone resistant *Escherichia coli* in pig herds. *Antibiotics*, 9(12), 1–10.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9120910>
- Ke, C. H., Lai, P. Y., Hsu, F. Y., Hsueh, P. R., Chiou, M. T., & Lin, C. N. (2024). Antimicrobial susceptibility and resistome of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Taiwan: a next-generation sequencing analysis. *Veterinary Quarterly*, 44(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2024.2335947>

- Kim, B., Hur, J., Lee, J. Y., Choi, Y., & Lee, J. H. (2016). Molecular serotyping and antimicrobial resistance profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in South Korea. *Veterinary Quarterly*, *36*(3), 137–144.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1155241>
- Kiss, I., Szigeti, K., Homonnay, Z. G., Tamás, V., Smits, H., & Krejci, R. (2021). Maternally derived antibody levels influence on vaccine protection against pcv2d challenge. *Animals*, *11*(8).
<https://doi.org/10.3390/ani11082231>
- Kitikoon, P., Nilubol, D., Erickson, B. J., Janke, B. H., Hoover, T. C., Sornsen, S. A., & Thacker, E. L. (2006). The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *112*(3–4), 117–128.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.02.008>
- Kleinmans, M., Fiebig, K., Tabeling, R., Swam, H., Duivelshof-Crienen, A., Ritzmann, M., & Eddicks, M. (2022). explorative field study on the use of oral fluids for the surveillance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in fattening farms by an Apx-Real-Time PCR. *Veterinary Sciences*, *9*(10).
<https://doi.org/10.3390/vetsci9100552>
- Klinkenberg, D., Tobias, T. J., Bouma, A., Van Leengoed, L. A. M. G., & Stegeman, J. A. (2014). Simulation study of the mechanisms underlying outbreaks of clinical disease caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in finishing pigs. *Veterinary Journal*, *202*(1), 99–105.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.06.015>
- Klobasa, F., Werhahn, E., & Butler, J. E. (1981). Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. *Research in Veterinary Science*, *31*(2), 195–206.
[https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32494-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32494-9)
- Kokotovic, B., & Angen, Ø. (2007). Genetic diversity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* assessed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(12), 3921–3929.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00906-07>
- Krejci, J., Nechvatalova, K., Kudlackova, H., Faldyna, M., Kucerova, Z., & Toman, M. (2005). Systemic and local antibody responses after experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in piglets with passive or active immunity. *Journal of Veterinary Medicine*, *52*(4), 190–196.
<https://doi.org/10.1111/J.1439-0450.2005.00844.X>
- Kristensen, C. S., Andreasen, M., Ersbøll, A. K., & Nielsen, J. P. (2004a). Antibody response in sows and piglets following vaccination against *Mycoplasma hyponeumoniae*, toxigenic *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *68*(1), 66–70.
- Kristensen, C. S., Angen, Andreasen, M., Takai, H., Nielsen, J. P., & Jorsal, S. E. (2004b). Demonstration of airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 between simulated pig units located at close range. *Veterinary Microbiology*, *98*(3–4), 243–249.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.10.026>

- Kucerova, Z., Hradecka, H., Nechvatalova, K., & Nedbalcova, K. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from clinical outbreaks of porcine respiratory diseases. *Veterinary Microbiology*, *150*(1–2), 203–206.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.01.016>
- Kuchiishi, S. S., Ramos Prigol, S., Bresolin, E., Fernandes Lenhard, B., Pissetti, C., García-Iglesias, M. J., Gutiérrez-Martín, C. B., Martínez-Martínez, S., Kreutz, L. C., & Frandoloso, R. (2023). Brazilian clinical strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida*: capsular diversity, antimicrobial susceptibility (in vitro) and proof of concept for prevention of natural colonization by multi-doses protocol of tildipirosin. *Antibiotics*, *12*(12).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12121658>
- Kuhnert, P., Schlatter, Y., & Frey, J. (2005). Characterization of the type I secretion system of the RTX toxin ApxII in "*Actinobacillus porcitosillarum*." *Veterinary Microbiology*, *107*(3–4), 225–232.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.020>
- Labrie, J., Pelletier-Jacques, G., Deslandes, V., Ramjeet, M., Auger, E., Nash, J. H. E., & Jacques, M. (2010). Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*, *41*(1).
<https://doi.org/10.1051/vetres/2009051>
- Langford, P. R., Loynds, B. M., & Simon Kroll, J. (1996). Cloning and molecular characterization of Cu,Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, *64*(12), 5035–5041.
<https://doi.org/10.1128/iai.64.12.5035-5041.1996>
- Lassnig, S., Hennig-Pauka, I., Bonilla, M. C., Mörgelin, M., Imker, R., von Köckritz-Blickwede, M., & de Buhr, N. (2024). Impact of bronchoalveolar lavage from influenza A virus diseased pigs on neutrophil functions and growth of co-infecting pathogenic bacteria. *Frontiers in Immunology*, *15*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1325269>
- Lee, S. H., Lee, S., Chae, C., & Ryu, D. Y. (2014). A recombinant chimera comprising the R1 and R2 repeat regions of *M. hyopneumoniae* P97 and the N-terminal region of *A. pleuropneumoniae* ApxIII elicits immune responses. *Veterinary Research*, *10*.
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-43>
- Leiser, R., & Kaufmann, P. (1994). Placental structure: in a comparative aspect. *Experimental and Clinical Endocrinology*, *102*(3), 122–134.
<https://doi.org/10.1055/S-0029-1211275>
- Lévesque, C., Provost, C., Labrie, J., Hernandez Reyes, Y., Burciaga Nava, J. A., Gagnon, C. A., & Jacques, M. (2014). *Actinobacillus pleuropneumoniae* possesses an antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS ONE*, *9*(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098434>
- Li, B., Fang, J., Zuo, Z., Yin, S., He, T., Yang, M., Deng, J., Shen, L., Ma, X., Yu, S., Wang, Y., & Ren, Z. (2018). Activation of porcine alveolar macrophages by *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide via the Toll-Like Receptor 4/NF- κ B-Mediated

- pathway. *Infection and Immunity*, 86(3).
<https://doi.org/10.1128/IAI.00642-17>
- Li, H., Liu, F., Peng, W., Yan, K., Zhao, H., Liu, T., Cheng, H., Chang, P., Yuan, F., Chen, H., & Bei, W. (2018). The CpxA/CpxR two-component system affects biofilm formation and virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(3), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00072>
- Li, H. S., Shin, M. K., Singh, B., Maharjan, S., Park, T. E., Kang, S. K., Yoo, H. S., Hong, Z. S., Cho, C. S., & Choi, Y. J. (2016a). Nasal immunization with mannan-decorated mucoadhesive HPMCP microspheres containing ApxIIA toxin induces protective immunity against challenge infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Journal of Controlled Release*, 233, 114–125.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.032>
- Li, L., Zhu, J., Yang, K., Xu, Z., Liu, Z., & Zhou, R. (2014). Changes in gene expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in response to anaerobic stress reveal induction of central metabolism and biofilm formation. *Journal of Microbiology*, 52(6), 473–481.
<https://doi.org/10.1007/s12275-014-3456-y>
- Li, R., Wang, J., Liu, L., Zhang, R., Hao, X., Han, Q., Wang, J., & Yuan, W. (2019). Direct detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine lungs and tonsils by real-time recombinase polymerase amplification assay. *Molecular and Cellular Probes*, 45, 14–18.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.03.007>
- Li, S. C., Huang, J. F., Hung, Y. T., Wu, H. H., Wang, J. P., Lin, J. H., Chen, Z. W., & Hsuan, S. L. (2022). In silico capsule locus typing for serovar prediction of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Genomics*, 8(4).
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000780>
- Li, T., Zhang, Q., Wang, R., Zhang, S., Pei, J., Li, Y., Li, L., & Zhou, R. (2019). The roles of flp1 and tadD in *Actinobacillus pleuropneumoniae* pilus biosynthesis and pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*, 126, 310–317.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.010>
- Li, X., Liu, Z., Gao, T., Liu, W., Yang, K., Guo, R., Li, C., Tian, Y., Wang, N., Zhou, D., Bei, W., & Yuan, F. (2023). Tea polyphenols protect tracheal epithelial tight junctions in lung during *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection via suppressing TLR-4/MAPK/PKC-MLCK signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14).
<https://doi.org/10.3390/ijms241411842>
- Li, Y., Bossé, J. T., Stringer, O. W., Hennig-Pauka, I., Mortensen, P., & Langford, P. R. (2023). Detection of novel *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars by Multiplex PCR: a cautionary tale. *Microbiology Spectrum*, 11(2).
<https://doi.org/10.1128/spectrum.04461-22>
- Li, Y., Bossé, J. T., Williamson, S. M., Maskell, D. J., Tucker, A. W., Wren, B. W., Rycroft, A. N., & Langford, P. R. (2016b). *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 8 predominates in England and Wales. *Veterinary Record*, 179(11), 8–9.
<https://doi.org/10.1136/vr.103820>

- Li, Y., Cao, S., Zhang, L., Lau, G. W., Wen, Y., Wu, R., Zhao, Q., Huang, X., Yan, Q., Huang, Y., & Wen, X. (2016c). A tolC-like protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is involved in antibiotic resistance and biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1618.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01618>
- Li, Y., Cao, S., Zhang, L., Yuan, J., Yang, Y., Zhu, Z., Wen, Y., Wu, R., Zhao, Q., Huang, X., Yan, Q., Huang, Y., Ma, X., & Wen, X. (2017). TOLC2 is required for the resistance, colonization and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*, *66*(8), 1170–1176.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000544>
- Li, Y., Cao, S., Zhang, L., Yuan, J., Zhao, Q., Wen, Y., Wu, R., Huang, X., Yan, Q., Huang, Y., Ma, X., Han, X., Miao, C., & Wen, X. (2019). A requirement of TolC1 for effective survival, colonization and pathogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, *134*, 103596.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103596>
- Liggett, A. D., Harrison, L. R., & Farrell, L. (1987). Sequential study of lesion development in experimental haemophilus pleuropneumonia. *Research in Veterinary Science*, *42*(2), 204–212.
[https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30687-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30687-8)
- Liu, F., Peng, W., Yan, K., Huang, J., Yuan, F., He, Q., Chen, H., & Bei, W. (2022). CpxAR of *Actinobacillus pleuropneumoniae* contributes to heat stress response by repressing expression of type IV pilus gene *apfA*. *Microbiology Spectrum*, *10*(6).
<https://doi.org/10.1128/spectrum.02523-22>
- Loera-Muro, A., & Angulo, C. (2018). New trends in innovative vaccine development against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, *217*, 66–75.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.028>
- Loera-Muro, V. M., Jacques, M., Tremblay, Y. D. N., Avelar-González, F. J., Loera-Muro, A., Ramírez-López, E. M., Medina-Figueroa, A., González-Reynaga, H. M., & Guerrero-Barrera, A. L. (2013). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms. *Microbiology*, *159*, 536–544.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.057992-0>
- Lopez-Bermudez, J., Quintanar-Guerrero, D., Lara Puente, H., Tórtora Perez, J., Suárez Güemez, F., Ciprián Carrasco, A., & Mendoza Elvira, S. (2014). Oral immunization against porcine pleuropneumonia using the cubic phase of monoolein and purified toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vaccine*, *32*(50), 6805–6811.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.09.056>
- Loreck, K., Mitrenga, S., Heinze, R., Ehricht, R., Engemann, C., Lueken, C., Ploetz, M., Greiner, M., & Meemken, D. (2020). Use of meat juice and blood serum with a miniaturised protein microarray assay to develop a multi-parameter IgG screening test with high sample throughput potential for slaughtering pigs. *Veterinary Research*, *16*(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02308-4>
- Luan, T., Wang, L., Zhao, J., Luan, H., Zhang, Y., Wang, C., Langford, P. R., Liu, S., Zhang, W., & Li, G. (2022). A CRISPR/Cas12a-assisted rapid detection platform by biosensing the *apxIVA*

- of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.928307>
- Ma, X., Zheng, B., Wang, J., Li, G., Cao, S., Wen, Y., Huang, X., Zuo, Z., Zhong, Z., & Gu, Y. (2021). Quinolone resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* revealed through genome and transcriptome analyses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18).
<https://doi.org/10.3390/ijms221810036>
- Machado, I., Mil-Homens, M., Silva, A. P., Thomas, P., Johnson, L., Feldmann, L., Glowzinski, L., Boykin, D., Bauman, T., Michael, A., Almeida, M., Linhares, D., Silva, G., & Holtkamp, D. J. (2024). Outbreak investigations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 15 in central Iowa in the winter of 2021-2022. *Journal of Swine Health and Production*, 32(1), 10–16.
<https://doi.org/10.54846/jshap/1362>
- MacInnes, J. I., Gottschalk, M., Lone, A. G., Metcalf, D. S., Ojha, S., Rosendal, T., Watson, S. B., & Friendship, R. M. (2008). Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 6(519), 242–248.
- Maes, D., Chiers, K., Haesebrouck, F., Laevens, H., Verdonck, M., & De Kruif, A. (2001). Herd factors associated with the seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2,3 and 9 in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research*, 32(5), 409–419.
<https://doi.org/10.1051/vetres:2001133>
- Maes, D., Chiers, K., Haesebrouck, F., Laevens, H., Verdonck, M. (2002). Seroprevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from Belgian fattening farms. *Veterinary Record*, 151, 206–210.
<https://doi.org/10.1136/vr.151.7.206>
- Maes, D., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., Segalés, J., & de Oliveira, L. G. (2023). Review on the methodology to assess respiratory tract lesions in pigs and their production impact. *Veterinary research*, 54(1), 8.
<https://doi.org/10.1186/s13567-023-01136-2>
- Maldonado, J., Valls, L., Martínez, E., & Riera, P. (2009). Isolation rates, serovars, and toxin genotypes of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* among pigs suffering from pleuropneumonia in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(6), 854–857.
<https://doi.org/10.1177/104063870902100615>
- Markowska-Daniel, I., Pomorska-Mól, M., & Pejsak, Z. (2011). The influence of age and maternal antibodies on the postvaccinal response against swine influenza viruses in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142(1–2), 81–86.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.03.019>
- Marois, C., Gottschalk, M., Morvan, H., Fablet, C., Madec, F., & Kobisch, M. (2009). Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology*,

- 135(3–4), 283–291.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.061>
- Martelli, P., Saleri, R., Ferrarini, G., De Angelis, E., Cavalli, V., Benetti, M., Ferrari, L., Canelli, E., Bonilauri, P., Arioli, E., Caleffi, A., Nathues, H., & Borghetti, P. (2016). Impact of maternally derived immunity on piglets' immune response and protection against porcine circovirus type 2 (PCV2) after vaccination against PCV2 at different age. *Veterinary Research*, 12(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-016-0700-1>
- Martelli, P., Terreni, M., Guazzetti, S., & Cavarani, S. (2006). Antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. *Journal of Veterinary Medicine*, 53(5), 229–233.
<https://doi.org/10.1111/J.1439-0450.2006.00952.X>
- Martínez-Boixaderas, N., Garza-Moreno, L., Sibila, M., & Segalés, J. (2022). Impact of maternally derived immunity on immune responses elicited by piglet early vaccination against the most common pathogens involved in porcine respiratory disease complex. *Porcine Health Management*, 8(11).
<https://doi.org/10.1186/s40813-022-00252-3>
- Martin-Valls, G. E., Cortey, M., Swam, H., Jiménez, M., & Mateu, E. (2023). High levels of maternally derived antibodies do not significantly interfere with the development of humoral and cell-mediated responses to Porcine circovirus 2 after intradermal vaccination. *Porcine Health Management*, 9(1).
<https://doi.org/10.1186/s40813-023-00335-9>
- Merialdi, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Luppi, A., Gozio, S., Pozzi, P., Spaggiari, B., & Martelli, P. (2012). Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *Veterinary Journal*, 193(1), 234–239.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.11.009>
- Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Haesebrouck, F., & Maes, D. (2011). A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *Veterinary Journal*, 187(3), 388–392.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.12.027>
- Mortensen, P., Toft, N., Kiss, I., Palya, V., Smits, H., & Tenk, M. (2022). Comparative efficacy in challenge dose models of a toxin expressing whole-cell vaccine against eight serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *Animals*, 12(23).
<https://doi.org/10.3390/ani12233244>
- Müllebnner, A., Sassu, E. L., Ladinig, A., Frömbling, J., Miller, I., Ehling-Schulz, M., Hennig-Pauka, I., & Duvigneau, J. C. (2018). *Actinobacillus pleuropneumoniae* triggers IL-10 expression in tonsils to mediate colonisation and persistence of infection in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 205, 17–23.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.008>
- Murata, H., & Namioka, S. (1977). The duration of colostral immunoglobulin uptake by the epithelium of the small intestine of neonatal piglets. *Journal of Comparative Pathology*, 87(3), 431–439.
[https://doi.org/10.1016/0021-9975\(77\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0021-9975(77)90032-9)

- Nadeau, M., Larivière, S., Higgins, R., & Martineau, G. P. (1988). Minimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 52(3), 315.
- Nechvatalova, K., Knotigova, P., Krejci, J., Faldyna, M., Gopfert, E., Satran, P., & Toman, M. (2005). Significance of different types and levels of antigen specific immunity to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in piglets. *Veterinarni Medicina*, 50(2), 47–60. <https://doi.org/10.17221/5596-vetmed>
- Nechvatalova, K., Kudlackova, H., Leva, L., Babickova, K., & Faldyna, M. (2011). Transfer of humoral and cell-mediated immunity via colostrum in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 142(1–2), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.03.022>
- Negrete-Abascal, E., García, R. M., Reyes, M. E., Godínez, D., & Garza, M. (2000). Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 191(1), 109–113. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09326.x>
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V. R., Guerrero, A. L., García, R. M., Reyes, M. E., & De la Garza, M. (1998). Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 62(3), 183–190.
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V. R., Serrano, J. J., Garcia, C., & de la Garza, M. (1994). Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 58(2), 83–86.
- Nesse, L. L., Osland, A. M., & Vestby, L. K. (2023). The role of biofilms in the pathogenesis of animal bacterial infections. *Microorganisms*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030608>
- Nielsen, R. (1975). Colostral transfer of immunity to *Haemophilus paraahaemolyticus* in pigs. *Nordisk Veterinaermedicin*, 27(6), 319–328.
- Nielsen, R. (1979). *Haemophilus paraahaemolyticus* serotypes. Pathogenicity and cross immunity. *Nordisk Veterinaermedicin*, 31(10), 407–413.
- Nielsen, R. (1995). Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 2 in porcine colostrum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay specific for serotype 2. *Veterinary Microbiology*, 43(4), 277–281. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00112-A](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00112-A)
- Nielsen, R., Van Den Bosch, J. F., Plambeck, T., Sørensen, V., & Nielsen, J. P. (2000). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 71(1–2), 81–87. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00157-1)
- Nietfeld, F., Hölting, D., Willems, H., Valentin-Weigand, P., Wurmser, C., Waldmann, K. H., Fries, R., & Reiner, G. (2020). Candidate genes and gene markers for the resistance to porcine

- pleuropneumonia. *Mammalian Genome*, 31(1–2), 54–67.
<https://doi.org/10.1007/s00335-019-09825-0>
- Niewiesk, S. (2014). Maternal antibodies: Clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Frontiers in Immunology*, 16(5) 446.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00446>
- Ondrackova, P., Leva, L., Kucerova, Z., Vicenova, M., Mensikova, M., & Faldyna, M. (2013). Distribution of porcine monocytes in different lymphoid tissues and the lungs during experimental *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection and the role of chemokines. *Veterinary Research*, 44(1).
<https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-98>
- O'Neill, C., Jones, S. C. P., Bossé, J. T., Watson, C. M., Williamson, S. M., Rycroft, A. N., Kroll, J. S., Hartley, H. M., & Langford, P. R. (2010). Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars in England and Wales. *Veterinary Record*, 167(17), 661–662.
<https://doi.org/10.1136/vr.c5106>
- Opriessnig, T., Hemann, M., Johnson, J. K., Heinen, S., Giménez-Lirola, L. G., O'Neill, K. C., Hoang, H., Yoon, K. J., Gottschalk, M., & Halbur, P. G. (2013). Evaluation of diagnostic assays for the serological detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* on samples of known or unknown exposure. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(1), 61–71.
<https://doi.org/10.1177/1040638712469607>
- Opriessnig, T., Patterson, A. R., Elsener, J., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2008). Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(3), 397–401.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00416-07>
- Overbeke, I. Van, Chiers, K., Charlier, G., Vandenberghe, I., Beeumen, J. Van, Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2002). Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 88(1), 59–74.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00080-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00080-9)
- Overbeke, I. Van, Chiers, K., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2001). Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and Transferrin-binding proteins. *Journal of Veterinary Medicine*, 48(1), 15–20.
<https://doi.org/10.1111/J.1439-0450.2001.00419.X>
- Ozawa, M., Kawano, M., Abo, H., Issiki, Y., Kumakawa, M., Kawanishi, M., Kojima, A., & Iwamoto, S. (2023). Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Japan using whole genome sequencing. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 102.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102062>
- Papatsiros, V., Tzika, E., Athanasiou, L., Tassis, P., Chaintoutis, S., & Christodouloupoulos, G. (2019). In vivo effectiveness of injectable antibiotics on the recovery of acute

- Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected pigs. *Microbial Drug Resistance*, 25(4), 603–610.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0277>
- Paradis, M.-A., Vessie, G. H., Merrill, J. K., Dick, C. P., Moore, C., Charbonneau, G., Gottschalk, M., Macinnes, J. I., Higgins, R., Mittal, K. R., Girard, C., Aramini, J. J., & Wilson, J. B. (2004). Efficacy of tilmicosin in the control of experimentally induced *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 68.
- Paradis, S. E., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M., & Jacques, M. (1994). High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infection and Immunity*, 62(8), 3311–3319.
<https://doi.org/10.1128/iai.62.8.3311-3319.1994>
- Park, J., Seo, K. W., Kim, S. H., Lee, H. Y., Kim, B., Lim, C. W., Kim, J. H., Yoo, H. S., & Jang, Y. S. (2015). Nasal immunization with M cell-targeting ligand-conjugated ApxIIA toxin fragment induces protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in a murine model. *Veterinary Microbiology*, 177(1–2), 142–153.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.005>
- Pattison, I. H., Howell, D. G., & Elliot, J. (1957). A *Haemophilus*-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesions. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 67, 320–330.
[https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(57\)80031-9](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(57)80031-9)
- Pereira, M. F., Rossi, C. C., Seide, L. E., Martins Filho, S., Dolinski, C. de M., & Bazzolli, D. M. S. (2018). Antimicrobial resistance, biofilm formation and virulence reveal *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains' pathogenicity complexity. *Research in Veterinary Science*, 118, 498–501.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.05.003>
- Perry, M. B., Altman, E., Brisson, J.-R., Beynon, L. M., & Richards, J. C. (1990). Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease*, 4(4), 299–308.
[https://doi.org/10.1016/0888-0786\(90\)90018-J](https://doi.org/10.1016/0888-0786(90)90018-J)
- Petri, F. A. M., Ferreira, G. C., Arruda, L. P., Malcher, C. S., Storino, G. Y., Almeida, H. M. de S., Sonalio, K., Silva, D. G. da, & Oliveira, L. G. de. (2023). Associations between Pleurisy and the Main Bacterial Pathogens of the Porcine Respiratory Diseases Complex (PRDC). *Animals*, 13(9).
<https://doi.org/10.3390/ani13091493>
- Pohl, S., Bertschinger, H. U., Frederiksen, W., & Mannheim, W. (1983). Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(3), 510–514.
<https://doi.org/10.1099/00207713-33-3-510>
- Pol, J. M. A., Van Leengoed, L. A. M. G., Stockhofe, N., Kok, G., & Wensvoort, G. (1997). Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the

- respiratory tract. *Veterinary Microbiology*, 55(1–4), 259–264.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01323-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01323-5)
- Pomorska-Mól, M., Dors, A., Kwit, K., Kowalczyk, A., Stasiak, E., & Pejsak, Z. (2017). Kinetics of single and dual infection of pigs with swine influenza virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, 201, 113–120.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.011>
- Pomorska-Mól, M., Markowska-Daniel, I., & Pejsak, Z. (2010). Evaluation of humoral and antigen-specific T-cell responses after vaccination of pigs against pseudorabies in the presence of maternal antibodies. *Veterinary Microbiology*, 144(3–4), 450–454.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.015>
- Pomorska-Mól, M., Markowska-Daniel, I., Rachubik, J., & Pejsak, Z. (2011). Effect of maternal antibodies and pig age on the antibody response after vaccination against Glässers disease. *Veterinary Research Communications*, 35(6), 337–343.
<https://doi.org/10.1007/s11259-011-9478-6>
- Poonsuk, K., & Zimmerman, J. (2018). Historical and contemporary aspects of maternal immunity in swine. *Animal Health Research Reviews*, 19(1), 31–45.
<https://doi.org/10.1017/S1466252317000123>
- Poulsen Nautrup, B., Van Vlaenderen, I., Mah, C., & Angulo, J. (2021). Do high levels of maternally derived antibodies interfere with the vaccination of piglets against porcine circovirus type 2? A literature review and data analysis. *Vaccines*, 9(8).
<https://doi.org/10.3390/vaccines9080923>
- Pyo, H. M., Hlasny, M., & Zhou, Y. (2015). Influence of maternally-derived antibodies on live attenuated influenza vaccine efficacy in pigs. *Vaccine*, 33(31), 3667–3672.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.044>
- Qi, W., Zhu, R., Bao, C., Xiao, J., Liu, B., Sun, M., Feng, X., Gu, J., Li, Y., & Lei, L. (2019). Porcine circovirus type 2 promotes *Actinobacillus pleuropneumoniae* survival during coinfection of porcine alveolar macrophages by inhibiting ROS production. *Veterinary Microbiology*, 233, 93–101.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.028>
- Rajao, D. S., Sandbulte, M. R., Gauger, P. C., Kitikoon, P., Platt, R., Roth, J. A., Perez, D. R., Loving, C. L., & Vincent, A. L. (2016). Heterologous challenge in the presence of maternally-derived antibodies results in vaccine-associated enhanced respiratory disease in weaned piglets. *Virology*, 491, 79–88.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.01.015>
- Ramírez-Castillo, F. Y., Loera-Muro, A., Vargas-Padilla, N. D., Moreno-Flores, A. C., Avelar-González, F. J., Harel, J., Jacques, M., Oropeza, R., Barajas-García, C. C., & Guerrero-Barrera, A. L. (2018). Incorporation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in preformed biofilms by *Escherichia coli* isolated from drinking water of swine farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 184.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00184>
- Ramjeet, M., Deslandes, V., Gouré, J., & Jacques, M. (2008). *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines: from bacterins to new insights into vaccination strategies. *Animal Health*

Research Reviews, 9(1), 25–45.

<https://doi.org/10.1017/S1466252307001338>

Ramjeet, M., Deslandes, V., St. Michael, F., Cox, A. D., Kobisch, M., Gottschalk, M., & Jacques, M. (2005). Truncation of the lipopolysaccharide outer core affects susceptibility to antimicrobial peptides and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39104–39114.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M502852200>

Reimer, D., Frey, J., Jansen, R., Veit, H. P., & Inzana, T. J. (1995). Molecular investigation of the role of ApxI and ApxII in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Microbial Pathogenesis*, 18, 197–209.

[https://doi.org/10.1016/s0882-4010\(95\)90049-7](https://doi.org/10.1016/s0882-4010(95)90049-7)

Reiner, G., Bertsch, N., Hoeltig, D., Selke, M., Willems, H., Gerlach, G. F., Tuemmler, B., Probst, I., Herwig, R., Drungowski, M., & Waldmann, K. H. (2014). Identification of QTL affecting resistance/susceptibility to acute *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in swine. *Mammalian Genome*, 25(3–4), 180–191.

<https://doi.org/10.1007/s00335-013-9497-4>

Renson, P., Fablet, C., Andraud, M., Normand, V., Lebret, A., Paboeuf, F., Rose, N., & Bourry, O. (2019). Maternally-derived neutralizing antibodies reduce vaccine efficacy against porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vaccine*, 37(31), 4318–4324.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.045>

Reyes, Y. H., Provost, C., Traesel, C. K., Jacques, M., & Gagnon, C. A. (2018). *Actinobacillus pleuropneumoniae* culture supernatant antiviral effect against porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs prior to the viral genome replication and transcription through actin depolymerization. *Journal of Medical Microbiology*, 67(2), 249–264.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000659>

Ristow, L. C., & Welch, R. A. (2019). RTX toxins ambush immunity's first cellular responders. *Toxins*, 11(12), 1–16.

<https://doi.org/10.3390/toxins11120720>

Roberts E., Hammer J.M., Lechtenberg K., Roycroft L., King S. (2011). Investigation of tiamulin hydrogen fumarate in-feed antibiotic for the control of porcine respiratory disease complex that includes *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production*, 19(4), 218–225.

<http://doi.org/10.54846/jshap/667>

Rodrigues, F. A. F., Silva, G. C. da, Santana, M. F., Bazzolli, D. M. S., Rossi, C. C., & Diaz, M. A. N. (2023). Essential oils isolated from popular medicinal plants and spices as alternative antimicrobial and antibiofilm compounds against the pig pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Ciência Rural*, 53(5).

<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220148>

Rosendal, S., & Mitchell, W. R. (1983). Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: A survey of Ontario pork producers, 1981. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47(1), 1–5.

- Rossi, C. C., Fernandes de Araújo, E., Vieira de Queiroz, M., & Bazzolli, D. M. S. (2013). Characterization of the omlA gene from different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: A new insight into an old approach. *Genetics and Molecular Biology*, 36(2), 243–251.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000012>
- Saade, G., Deblanc, C., Bougon, J., Marois-Créhan, C., Fablet, C., Auray, G., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., Gagnon, C. A., Zhu, J., Gottschalk, M., Summerfield, A., Simon, G., Bertho, N., & Meurens, F. (2020). Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Veterinary Research*, 51, 80.
<https://doi.org/10.1186/s13567-020-00807-8>
- Sakano, T., Shibata, I., Samegai, Y., Taneda, A., Okada, M., Irisawa, T., & Sato, S. (1993). Experimental pneumonia of pigs infected with Aujeszky's disease virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 55(4), 575–579.
<https://doi.org/10.1292/JVMS.55.575>
- Salmon, H., Berri, M., Gerds, V., & Meurens, F. (2009). Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(3), 384–393.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.07.007>
- Sandbulte, M. R., Platt, R., Roth, J. A., Henningson, J. N., Gibson, K. A., Rajao, D. S., Loving, C. L., & Vincent, A. L. (2014). Divergent immune responses and disease outcomes in piglets immunized with inactivated and attenuated H3N2 swine influenza vaccines in the presence of maternally-derived antibodies. *Virology*, 464–465(1), 45–54.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.027>
- Sárközi, R., Akrai, L., & Odor, L. (2015). Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Serovar 16. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(4), 444–450.
<https://doi.org/10.1556/004.2015.041>
- Sárközi, R., Makrai, L., & Fodor, L. (2018). *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(3), 343–349.
<https://doi.org/10.1556/004.2018.031>
- Sárközi, R., Makrai, L., & Fodor, L. (2022). Isolation of Biotype 1 Serotype 12 and Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from Wild Boars. *Pathogens*, 11(5).
<https://doi.org/10.3390/pathogens11050505>
- Sassu, E. L., Bossé, J. T., Tobias, T. J., Gottschalk, M., Langford, P. R., & Hennig-Pauka, I. (2018). Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*: knowledge, gaps and challenges. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 72–90.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12739>
- Sassu, E. L., Frömbling, J., Duvigneau, J. C., Miller, I., Müllebner, A., Gutiérrez, A. M., Grunert, T., Patzl, M., Saalmüller, A., von Altrock, A., Menzel, A., Ganter, M., Spergser, J., Hewicker-Trautwein, M., Verspohl, J., Ehling-Schulz, M., & Hennig-Pauka, I. (2017a). Host-pathogen interplay at primary infection sites in pigs challenged with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-017-0979-6>

- Sassu, E. L., Ladinig, A., Talker, S. C., Stadler, M., Knecht, C., Stein, H., Frömbling, J., Richter, B., Spergser, J., Ehling-Schulz, M., Graage, R., Hennig-Pauka, I., & Gerner, W. (2017b). Frequency of Th17 cells correlates with the presence of lung lesions in pigs chronically infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Research*, *48*(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s13567-017-0411-z>
- Savoye, C., Jobert, J. L., Berthelot-Hérault, F., Keribin, A. M., Cariolet, R., Morvan, H., Madec, F., & Kobisch, M. (2000). A PCR assay used to study aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from samples of live pigs under experimental conditions. *Veterinary Microbiology*, *73*(4), 337–347.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00181-4)
- Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T. J., MacInnes, J. I., Segers, R. P. A. M., & Frey, J. (1999). Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, *145*(8), 2105–2116.
<https://doi.org/10.1099/13500872-145-8-2105>
- Schaller, A., Kuhnert, P., De La Puente-Redondo, V. A., Nicolet, J., & Frey, J. (2000). Apx toxins in *Pasteurellaceae* species from animals. *Veterinary Microbiology*, *74*(4), 365–376.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00204-2)
- Scherrer, S., Peterhans, S., Neupert, C., Rademacher, F., Bartolomei, G., Sidler, X., & Stephan, R. (2022). Development of a novel high resolution melting assay for identification and differentiation of all known 19 serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *MicrobiologyOpen*, *11*(2).
<https://doi.org/10.1002/mbo3.1272>
- Schuwerk, L., Hoeltig, D., Waldmann, K. H., Valentin-Weigand, P., & Rohde, J. (2021). Sero- and apx-typing of German *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates from 2010 to 2019 reveals a predominance of serovar 2 with regular Apx-profile. *Veterinary Research*, *52*(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s13567-020-00890-x>
- Seo, K. W., Kim, D. H., Kim, A. H., Yoo, H. S., Lee, K. Y., & Jang, Y. S. (2011). Characterization of antigenic determinants in ApxIIA exotoxin capable of inducing protective immunity to *Actinobacillus pleuropneumoniae* challenge. *Immunological Investigations*, *40*(5), 465–480.
<https://doi.org/10.3109/08820139.2011.558151>
- Serebrin, S., Rosendal, S., Valdivieso-Garcia, A., & Little, P. B. (1991). Endothelial cytotoxicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Research in Veterinary Science*, *50*(1), 18–22.
[https://doi.org/10.1016/0034-5288\(91\)90047-R](https://doi.org/10.1016/0034-5288(91)90047-R)
- Shakarji, L., Mikael, L. G., Srikumar, R., Kobisch, M., Coulton, J. W., & Jacques, M. (2006). Fhva and HgbA, outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Their role as virulence determinants. *Canadian Journal of Microbiology*, *52*(4), 391–396.
<https://doi.org/10.1139/W05-135>
- Shao, M., Wang, Y., Wang, C., Guo, Y., Peng, Y., Liu, J., Li, G., Liu, H., & Liu, S. (2010). Evaluation of multicomponent recombinant vaccines against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *52*(1).
<https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-52>

- Shin, M. K., Kang, M. L., Cha, S. Bin, Lee, W. J., Sung, J. H., & Yoo, H. S. (2011). An immunosorbent assay based on the recombinant ApxIA, ApxIIA, and ApxIIIA toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its application to field sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 736–742.
<https://doi.org/10.1177/1040638711407889>
- Shin, M. K., Kang, M. L., Jung, M. H., Cha, S. Bin, Lee, W. J., Kim, J. M., Kim, D. H., & Yoo, H. S. (2013). Induction of protective immune responses against challenge of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by oral administration with *Saccharomyces cerevisiae* expressing Apx toxins in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 151(1–2), 132–139.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.11.003>
- Shope, R. E. (1964). Porcine contagious pleuropneumonia I. Experimental transmission, etiology, and pathology. *J Exp Med*, 119(1), 357–368.
- Sidibé, M., Messier, S., Larivière, S., Gottschalk, M., & Mittal, K. R. (1993). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 57(3), 204–208.
- Siegrist, C. A. (2003). Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: Review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine*, 21(24), 3406–3412.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00342-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00342-6)
- Šinkora, M., & Butler, J. E. (2009). The ontogeny of the porcine immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(3), 273–283.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.07.011>
- Sipos, W., Cvjetković, V., Dobrokes, B., & Sipos, S. (2021). Evaluation of the efficacy of a vaccination program against *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on lung-scoring at slaughter. *Animals*, 11(10).
<https://doi.org/10.3390/ani11102778>
- Siteavu, M. I., Drugea, R. I., Pitoiu, E., & Ciobotaru-Pirvu, E. (2023). Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, and *Pasteurella multocida* isolated from romanian swine farms. *Microorganisms*, 11(10).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11102410>
- Sjölund, M., De La Fuente, A. J. M., Fossum, C., & Wallgren, P. (2009). Responses of pigs to a re-challenge with *Actinobacillus pleuropneumonias* after being treated with different antimicrobials following their initial exposure. *Veterinary Record*, 164(18), 550–555.
<https://doi.org/10.1136/vr.164.18.550>
- Sjölund, M., Fossum, C., De La Fuente, A. J. M., Alava, M., Juul-Madsen, H. R., Lampreave, F., & Wallgren, P. (2011a). Effects of different antimicrobial treatments on serum acute phase responses and leucocyte counts in pigs after a primary and a secondary challenge infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Record*, 169(3), 70.
<https://doi.org/10.1136/vr.d2268>
- Sjölund, M., & Wallgren, P. (2010). Field experience with two different vaccination strategies aiming to control infections with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a fattening pig herd.

Acta Veterinaria Scandinavica, 52(1).

<https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-23>

Sjölund, M., Zoric, M., Persson, M., Karlsson, G., & Wallgren, P. (2011b). Disease patterns and immune responses in the offspring to sows with high or low antibody levels to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Research in Veterinary Science*, 91(1), 25–31.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.025>

Somogyi, Z., Mag, P., Simon, R., Kerek, Á., Makrai, L., Biksi, I., & Jerzsele, Á. (2023). Susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* Isolated from Pigs in Hungary between 2018 and 2021. *Antibiotics*, 12(8).

<https://doi.org/10.3390/antibiotics12081298>

Stancheva, S. G., Frömbling, J., Sassu, E. L., Hennig-Pauka, I., Ladinig, A., Gerner, W., Grunert, T., & Ehling-Schulz, M. (2022). Proteomic and immunoproteomic insights into the exoproteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, the causative agent of porcine pleuropneumonia. *Microbial Pathogenesis*, 172.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105759>

Straw, B., Tuovinen, V., & Bigras-Poulin, M. (1989). Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 195(12), 1702–1706.

Stringer, O. W., Bossé, J. T., Lacouture, S., Gottschalk, M., Fodor, L., Angen, Ø., Velazquez, E., Penny, P., Lei, L., Langford, P. R., & Li, Y. (2021a). Proposal of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars. *Veterinary Microbiology*, 255.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109021>

Stringer, O. W., Bossé, J. T., Lacouture, S., Gottschalk, M., Fodor, L., Angen, Ø., Velazquez, E., Penny, P., Lei, L., Langford, P. R., & Li, Y. (2021b). Rapid detection and typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars directly from clinical samples: Combining FTA® card technology with Multiplex PCR. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 728660

<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.728660>

Stygar, A. H., Niemi, J. K., Oliviero, C., Laurila, T., & Heinonen, M. (2016). Economic value of mitigating *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pig fattening herds. *Agricultural Systems*, 144, 113–121.

<https://doi.org/10.1016/j.agsy.2016.02.005>

Sun, D., Mi, K., Hao, H., Xie, S., Chen, D., & Huang, L. (2020). Optimal regimens based on PK/PD cutoff evaluation of ceftiofur against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine. *Veterinary Research*, 16(1).

<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02589-9>

Tang, H., Wang, R., Pang, S., Han, W., Zhang, Q., Fang, Q., Chen, X., Huang, Q., Qiu, D., Zhou, R., & Li, L. (2023). Native ApxIIA secreted by *Actinobacillus pleuropneumoniae* induces apoptosis in porcine alveolar macrophages dependent on concentration and acylation. *Veterinary Microbiology*, 287, 109908

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109908>

- Tascón, R. I., Vázquez-Boland, J. A., Gutiérrez-Martín, C. B., Rodríguez-Barbosa, I., & Rodríguez-Ferri, E. Z. F. (1994). The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Molecular Microbiology*, *14*(2), 207–216.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01282.x>
- Tegetmeyer, H. E., Jones, S. C. P., Langford, P. R., & Baltes, N. (2008). ISApI1, a novel insertion element of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, prevents ApxIV-based serological detection of serotype 7 strain AP76. *Veterinary Microbiology*, *128*(3–4), 342–353.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.025>
- Teshima, K., Hirano, H., Ushiyama, K., Shibuya, K., Nagai, S., Sasakawa, C., & To, H. (2019). Isolation and characterization of atypical *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15 lacking the ApxIIA genes in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, *81*(3), 480–485.
<https://doi.org/10.1292/jvms.18-0421>
- Teshima, K., Lee, J., To, H., Kamada, T., Tazumi, A., Hirano, H., Maruyama, M., Ogawa, T., Nagai, S., Turni, C., & Tsutsumi, N. (2017). Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15 in pig sera. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *79*(12), 1968–1972.
<https://doi.org/10.1292/jvms.17-0374>
- To, H., Konnai, M., Teshima, K., Tsutsumi, N., Ito, S., Sato, M., Shibuya, K., & Nagai, S. (2023). Pulmonary lesions with asteroid bodies in a pig experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *85*(10), 1131–1135.
<https://doi.org/10.1292/JVMS.23-0202>
- To, H., Maldonado, J., Tsutsumi, N., Gottschalk, M., Frey, J., & Nagai, S. (2024). Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovar 2 isolates reportedly reacted with the serovar 4 antiserum, and development of a multiplex PCR for O-antigen typing. *Veterinary Microbiology*, *291*.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110030>
- To, H., Nagai, S., Iwata, A., Koyama, T., Oshima, A., & Tsutsumi, N. (2016). Genetic and antigenic characteristics of ApxIIA and ApxIIIA from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3, 4, 6, 8 and 15. *Microbiology and Immunology*, *60*(7), 447–458.
<https://doi.org/10.1111/1348-0421.12388>
- Tobias, T. J., Bouma, A., Daemen, A. J., Wagenaar, J. A., Stegeman, A., & Klinkenberg, D. (2013). Association between transmission rate and disease severity for *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Veterinary Research*, *44*(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-2>
- Tobias, T. J., Bouma, A., Klinkenberg, D., Daemen, A. J. J. M., Stegeman, J. A., Wagenaar, J. A., & Duim, B. (2012). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs by real-time quantitative PCR for the apxIVA gene. *Veterinary Journal*, *193*(2), 557–560.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.02.004>
- Tobias, T. J., Bouma, A., van den Broek, J., van Nes, A., Daemen, A. J. J. M., Wagenaar, J. A., Stegeman, J. A., & Klinkenberg, D. (2014a). Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* among weaned piglets on endemically infected farms. *Preventive*

- Veterinary Medicine*, 117(1), 207–214.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.07.017>
- Tobias, T. J., Klinkenberg, D., Bouma, A., Van den Broek, J., Daemen, A. J. J. M., Wagenaar, J. A., & Stegeman, J. A. (2014b). A cohort study on *Actinobacillus pleuropneumoniae* colonisation in suckling piglets. *Preventive Veterinary Medicine*, 114(3–4), 223–230.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.02.008>
- Torremorell, M., Pijoan, C., Janni, K., Walker, R., & Joo, H. S. (1997). Airborne transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nursery pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 58(8), 828–832.
<https://doi.org/10.2460/ajvr.1997.58.08.828>
- Tremblay, Y. D. N., Labrie, J., Chénier, S., & Jacques, M. (2017). *Actinobacillus pleuropneumoniae* grows as aggregates in the lung of pigs: is it time to refine our in vitro biofilm assays? *Microbial Biotechnology*, 10(4), 756–760.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12432>
- Tuboly, S., Bernáth, S., Glávits, R., & Medveczky, I. (1988). Intestinal absorption of colostrum lymphoid cells in newborn piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 20(1), 75–85.
[https://doi.org/10.1016/0165-2427\(88\)90027-X](https://doi.org/10.1016/0165-2427(88)90027-X)
- Tumamao, J. Q., Bowles, R. E., Van Den Bosch, H., Klaasen, H. L. B. M., Fenwick, B. W., & Blackall, P. J. (2004a). An evaluation of the role of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1 and 15 in the protection provided by sub-unit and live streptomycin-dependent pleuropneumonia vaccines. *Australian Veterinary Journal*, 82(12), 773–780.
<https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.2004.TB13248.X>
- Tumamao, J. Q., Bowles, R. E., Van Den Bosch, H., Klaasen, H. L. B. M., Fenwick, B. W., Storie, G. J., & Blackall, P. J. (2004b). Comparison of the efficacy of a subunit and a live streptomycin-dependent porcine pleuropneumonia vaccine. *Australian Veterinary Journal*, 82(6), 370–374.
<https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.2004.TB11108.X>
- Udeze, F. A., & Kadis, S. (1992). Inhibition of bactericidal activity of anticapsular antibody by nonspecific antibodies reactive with surface-exposed antigenic determinants on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and Immunity*, 60(9), 3852–3860.
<https://doi.org/10.1128/iai.60.9.3852-3860.1992>
- Udeze, F. A., Latimer, K. S., & Kadis, S. (1987). Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *American Journal of Veterinary Research*, 48(5), 768–773.
- Van Den Bosch, H., & Frey, J. (2003). Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs. *Vaccine*, 21(25–26), 3601–3607.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00410-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00410-9)
- Van Kerkhof, A. D. E., Haesebrouck, F., Chiers, K., Ducatelle, R., Kamp, E. M., & Smits, M. A. (1996). Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its metabolites on porcine

- alveolar epithelial cells. *Infection and Immunity*, 64(9), 3905–3907.
<https://doi.org/10.1128/iai.64.9.3905-3907.1996>
- Van Oirschot, J. T. (1987). Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: comparison with one or two doses of attenuated vaccines in pigs with high maternal antibody titres. *Research in Veterinary Science*, 42(1), 12–16.
[https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30649-0](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30649-0)
- Van Oirschot, J. T. (1991). Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: protective immunity at 2 weeks, 2 months and 4 months after vaccination in pigs with maternal antibodies. *Veterinary Microbiology*, 27(2), 103–113.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90001-V](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90001-V)
- Van Oirschot, J. T., & De Leeuw, P. W. (1985). Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease. 4. Comparison with one or two doses of an inactivated vaccine in pigs with moderate maternal antibody titres. *Veterinary Microbiology*, 10(5), 401–408.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(85\)90022-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(85)90022-7)
- Vanni, M., Merenda, M., Barigazzi, G., Garbarino, C., Luppi, A., Tognetti, R., & Intorre, L. (2012). Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine. *Veterinary Microbiology*, 156(1–2), 172–177.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.022>
- Velthuis, A. G. J., De Jong, M. C. M., Kamp, E. M., Stockhofe, N., & Verheijden, J. H. M. (2003). Design and analysis of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* transmission experiment. *Preventive Veterinary Medicine*, 60(1), 53–68.
[https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00082-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00082-5)
- Velthuis, A. G. J., De Jong, M. C. M., Stockhofe, N., Vermeulen, T. M. M., & Kamp, E. M. (2002). Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs is characterized by variation in infectivity. *Epidemiology and Infection*, 129(1), 203–214.
<https://doi.org/10.1017/S0950268802007252>
- Vigre, H., Angen, Ø., Barfod, K., Lavritsen, D. T., & Sørensen, V. (2002). Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies. *Veterinary Microbiology*, 89(2–3), 151–159.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00149-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00149-9)
- Vigre, H., Ersbøll, A. K., & Sørensen, V. (2003). Decay of Acquired Colostral Antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Pigs. *Journal of Veterinary Medicine*, 50(9), 430–435.
<https://doi.org/10.1046/J.0931-1793.2003.00700.X>
- Vilaró, A., Karstensen, K. T., Cavaco, L. M., Angen, Ø., Solé, E., Seró, I., Novell, E., Enrique-Tarancón, V., Guitart-Matas, J., Migura-Garcia, L., & Fraile, L. (2024). An investigation of the transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* within vertically integrated systems using whole genome sequencing. *Veterinary Microbiology*, 295.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110157>
- Vilaró, A., Novell, E., Enrique-Tarancón, V., Baliellas, J., & Fraile, L. (2023). Susceptibility trends of swine respiratory pathogens from 2019 to 2022 to antimicrobials commonly used in

- Spain. *Porcine Health Management*, 9(1).
<https://doi.org/10.1186/s40813-023-00341-x>
- Vilaró, A., Novell, E., Enrique-Tarancon, V., Baliellas, J., Migura-García, L., & Fraile, L. (2023). The susceptibility trends of respiratory and enteric porcine pathogens to last-resource antimicrobials. *Antibiotics*, 12(11).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12111575>
- Vilaró, A., Novell, E., Enrique-Tarancon, V., Balielles, J., Migura-García, L., & Fraile, L. (2022). Antimicrobial susceptibility testing of porcine bacterial pathogens: Investigating the prospect of testing a representative drug for each antimicrobial family. *Antibiotics*, 11(5).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11050638>
- Vilaró, A., Novell, E., Enrique-Tarancón, V., Balielles, J., Vilalta, C., Martínez, S., & Sauce, L. J. F. (2020). Antimicrobial susceptibility pattern of porcine respiratory bacteria in Spain. *Antibiotics*, 9(7), 1–13.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9070402>
- Villa-Mancera, A., Hernández-Guzmán, K., Olivares-Pérez, J., & Molina-Mendoza, P. (2016). Influence of four commercial porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines on the improvement of production parameters in pigs with maternally derived antibodies. *Livestock Science*, 190, 10–15.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.05.013>
- Wallgren, P., Nörregård, E., Molander, B., Persson, M., & Ehlorsson, C. J. (2016). Serological patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* in pig herds affected by pleuritis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(1).
<https://doi.org/10.1186/s13028-016-0252-1>
- Wang, L., Qin, W., Ruidong, Z., Liu, S., Zhang, H., Sun, C., Feng, X., Gu, J., Du, C., Han, W., Langford, P. R., & Lei, L. (2015a). Differential gene expression profiling of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during induction of primary alveolar macrophage apoptosis in piglets. *Microbial Pathogenesis*, 78, 74–86.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.11.017>
- Wang, L., Qin, W., Yang, S., Zhai, R., Zhou, L., Sun, C., Pan, F., Ji, Q., Wang, Y., Gu, J., Feng, X., Du, C., Han, W., Langford, P. R., & Lei, L. (2015b). The Adh adhesin domain is required for trimeric autotransporter Apa1-mediated *Actinobacillus pleuropneumoniae* adhesion, autoaggregation, biofilm formation and pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 177(1–2), 175–183.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.026>
- Wang, L., Zhao, X., Zhu, C., Zhao, Y., Liu, S., Xia, X., Liu, X., Zhang, H., Xu, Y., Hang, B., Sun, Y., Chen, S., Jiang, J., Bai, Y., Zhang, G., Lei, L., Richard, L. P., Fotina, H., & Hu, J. (2020a). The antimicrobial peptide MPX kills *Actinobacillus pleuropneumoniae* and reduces its pathogenicity in mice. *Veterinary Microbiology*, 243.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108634>
- Wang, Y., Gong, S., Dong, X., Li, J., Grenier, D., & Yi, L. (2020b). In vitro mixed biofilm of *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* impacts antibiotic susceptibility

- and modulates virulence factor gene expression. *Frontiers in Microbiology*, *11*.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00507>
- Ward, C. K., & Inzana, T. J. (1994). Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide. *Journal of Immunology*, *153*(5), 2110–2121.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.153.5.2110>
- Watson, D. L. (1980). Immunological functions of the mammary gland and its secretion-- comparative review. *Australian Journal of Biological Sciences*, *33*(4), 403–422.
<https://doi.org/10.1071/BI9800403>
- Watt, A. E., Browning, G. F., Markham, P. F., & Marena, M. S. (2020). Detection of naturally aerosolized *Actinobacillus pleuropneumoniae* on pig farms by cyclonic air sampling and qPCR. *Veterinary Microbiology*, *250*.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108856>
- Williams, P. P. (1993). Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostrum leukocytes by neonatal pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *57*(1), 1-8.
- Wilson, A. D., Stokes, C. R., & Bourne, F. J. (1989). Effect of age on absorption and immune responses to weaning or introduction of novel dietary antigens in pigs. *Research in Veterinary Science*, *46*(2), 180–186.
[https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31142-1](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31142-1)
- Wrathall, A. E., Cartwright, S. F., Wells, D. E., & Jones, P. C. (1987). Maternally-derived antibodies to porcine parvovirus and their effect on active antibody production after vaccination with an inactivated oil-emulsion vaccine. *The Veterinary Record*, *120*(20), 475–478.
<https://doi.org/10.1136/VR.120.20.475>
- Wu, C. M., Chen, Z. W., Chen, T. H., Liao, J. W., Lin, C. C., Chien, M. S., Lee, W. C., & Hsuan, S. L. (2011). Mitogen-activated protein kinases p38 and JNK mediate *Actinobacillus pleuropneumoniae* exotoxin ApxI-induced apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology*, *151*(3–4), 372–378.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.033>
- Wu, H. C., Yeh, P. H., Hsueh, K. J., Yang, W. J., & Chu, C. Y. (2018). Recombinant ApxIV protein enhances protective efficacy against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice and pigs. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(6), 1366–1376.
<https://doi.org/10.1111/jam.13726>
- Xiao, L., Zhou, L., Sun, C., Feng, X., Du, C., Gao, Y., Ji, Q., Yang, S., Wang, Y., Han, W., Langford, P. R., & Lei, L. (2012). Apa is a trimeric autotransporter adhesin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* responsible for autoagglutination and host cell adherence. *Journal of Basic Microbiology*, *52*(5), 598–607.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201100365>
- Xie, F., Li, G., Zhou, L., Zhang, Y., Cui, N., Liu, S., & Wang, C. (2017a). Attenuated *Actinobacillus pleuropneumoniae* double-deletion mutant S-8ΔclpP/apxIIC confers protection against

- homologous or heterologous strain challenge. *Veterinary Research*, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/s12917-016-0928-9>
- Xie, F., Wang, Y., Li, G., Liu, S., Cui, N., Liu, S., Langford, P. R., & Wang, C. (2017b). The SapA Protein Is Involved in Resistance to Antimicrobial Peptide PR-39 and Virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00811>
- Xu, K., Zhao, Q., Wen, X., Wu, R., Wen, Y., Huang, X., Huang, Y., Yan, Q., Han, X., Ma, X., Chang, Y. F., & Cao, S. (2018). A trivalent Apx-fusion protein delivered by *E. coli* outer membrane vesicles induce protection against *Actinobacillus pleuropneumoniae* of serotype 1 and 7 challenge in a murine model. *PLoS ONE*, 13(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191286>
- Yang, W., Pin, C., Haibing, G., Yang, C., Hui, L., & Qigai, H. (2009). Loop-mediated isothermal amplification targeting the apxIVA gene for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*, 300(1), 83–89.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01779.x>
- Yang, X., Cheng, Y. T., Tan, M. F., Zhang, H. W., Liu, W. Q., Zou, G., Zhang, L. S., Zhang, C. Y., Deng, S. M., Yu, L., Hu, X. Y., Li, L., & Zhou, R. (2015). Overexpression of Porcine Beta-Defensin 2 enhances resistance to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Infection and Immunity*, 83(7), 2836–2843.
<https://doi.org/10.1128/IAI.03101-14>
- Yao, L., Yang, L., Ling, Y., Wei, Y., Shen, X., & Ding, H. (2022). Pharmacokinetic / Pharmacodynamic relationships of tulathromycin against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in a porcine tissue cage infection model. *Frontiers in Veterinary Science*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.822432>
- Yao, X., Song, Q., Zhu, W., Wei, J., Shao, D., Liu, K., Li, Z., Qiu, Y., Ma, Z., Xia, L., & Li, B. (2023). Characterization of small plasmids carrying florfenicol resistance gene floR in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* isolates from swine in China. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1084491.
<https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1084491/BIBTEX>
- Yu, S., Zuo, Z., Cui, H., Li, M., Peng, X., Zhu, L., Zhang, M., Li, X., Xu, Z., Gan, M., Deng, J., Fang, J., Ma, J., Su, S., Wang, Y., Shen, L., Ma, X., Ren, Z., Wu, B., & Hu, Y. (2013). Transcriptional profiling of hilar nodes from pigs after experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 23516–23532.
<https://doi.org/10.3390/ijms141223516>
- Yuan, F., Liao, Y., You, W., Liu, Z., Tan, Y., Zheng, C., BinWang, Zhou, D., Tian, Y., & Bei, W. (2014). Deletion of the *znuA* virulence factor attenuates *Actinobacillus pleuropneumoniae* and confers protection against homologous or heterologous strain challenge. *Veterinary Microbiology*, 174(3–4), 531–539.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.10.016>
- Zhang, F., Cao, S., Zhu, Z., Yang, Y., Wen, X., Chang, Y. F., Huang, X., Wu, R., Wen, Y., Yan, Q., Huang, Y., Ma, X., & Zhao, Q. (2016). Immunoprotective efficacy of six in vivo-induced antigens against *Actinobacillus pleuropneumoniae* as potential vaccine candidates in

- murine model. *Frontiers in Microbiology*, 7(10).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01623>
- Zhang, L., Luo, W., Xiong, R., Li, H., Yao, Z., Zhuo, W., Zou, G., Huang, Q., & Zhou, R. (2022a). A combinatorial vaccine containing inactivated bacterin and subunits provides protection against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in mice and pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.902497>
- Zhang, L., Wang, H., Bai, Y., Wang, L., Bai, Y., & Hu, J. (2023a). Evaluation of the mutant selection window of danofloxacin against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in an in vitro dynamic model. *Frontiers in Veterinary Science*, 10.
<https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1107608>
- Zhang, L., Zhao, F., Xu, H., Chen, Y., Qi, C., & Liu, J. (2022b). HtrA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is a virulence factor that confers resistance to heat shock and oxidative stress. *Gene*, 841.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146771>
- Zhang, Q., Peng, L., Han, W., Chen, H., Tang, H., Chen, X., Langford, P. R., Huang, Q., Zhou, R., & Li, L. (2023b). The morphology and metabolic changes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* during its growth as a biofilm. *Veterinary Research*, 54(1), 42.
<https://doi.org/10.1186/s13567-023-01173-x>
- Zhou, Y., Li, L., Chen, Z., Yuan, H., Chen, H., & Zhou, R. (2013). Adhesion protein ApfA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is required for pathogenesis and is a potential target for vaccine development. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(2), 287–294.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00616-12>
- Zhu, J., Zhu, R., Jiang, H., Li, Z., Jiang, X., Li, F., Zhang, F., Feng, X., Gu, J., Li, N., & Lei, L. (2023). Adh Promotes *Actinobacillus pleuropneumoniae* Survival in Porcine Alveolar Macrophages by Inhibiting CHAC2-Mediated Respiratory Burst and Inflammatory Cytokine Expression. *Cells*, 12(5).
<https://doi.org/10.3390/cells12050696>
- Zhu, R., Bao, C., Liu, B., Xiao, J., Sun, C., Feng, X., Langford, P. R., Li, Y., & Lei, L. (2020). iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of peripheral blood serum in piglets infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *AMB Express*, 10(1).
<https://doi.org/10.1186/s13568-020-01057-9>
- Zhu, Z., Antenucci, F., Winther-Larsen, H. C., Skovgaard, K., & Bojesen, A. M. (2022). Outer membrane vesicles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* exert immunomodulatory effects on porcine alveolar macrophages. *Microbiology Spectrum*, 10(5).
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01819-22>
- Zuo, Z., Cui, H., Li, M., Peng, X., Zhu, L., Zhang, M., Ma, J., Xu, Z., Gan, M., Deng, J., Li, X., & Fang, J. (2013). Transcriptional profiling of swine lung tissue after experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10626–10660.
<https://doi.org/10.3390/ijms140510626>

11. ANEXOS

11.1. Tabla de medias del valor S/P obtenidos con las pruebas ELISA frente a la toxina ApxI, II, III, IV y la proteína OmpA con intervalo de confianza al 95% en las cerdas del grupo

A

ELISA	Media	Std. Err.	IC95% (Media valor S/P)	
			inf	sup
ApxI	0,541	0,170	0,126	0,956
ApxII	2,377	0,270	1,717	3,037
ApxIII	0,913	0,200	0,425	1,402
ApxIV	1,412	0,183	0,965	1,859
OmpA	1,164	0,103	0,912	1,416

11.2. Valor S/P ApxI por animal y edad en el grupo A

ID. Lechón	CERDA	SEXO	24H	RESULTADOS APX I LECHONES GRUPO A (VALOR S/P)										
				S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	7553	MACHO	0,252	0,085	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	7553	HEMBRA	0,085	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	7553	MACHO	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	7553	MACHO	0,419	0,109	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	7553	HEMBRA	1,358	0,341	0,170	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	7553	MACHO	0,343	0,103	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7	6461	MACHO	1,375	0,236	0,109	0,097	0,051	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	6461	HEMBRA	0,621	0,280	0,119	0,008	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
9	6461	HEMBRA	0,853	0,730	0,427	0,112	0,052	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	6461	MACHO	1,300	0,762	0,342	0,412	0,253	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
11	6461	MACHO	0,803	0,539	0,198	0,093	0,205	0,032	0,001	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
12	6461	HEMBRA	0,972	0,415	0,083	0,056	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
13	7919	MACHO	0,118	0,205	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
14	7919	HEMBRA	0,147	0,053	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
15	7919	MACHO	0,110	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
16	7919	MACHO	0,086	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
17	7919	MACHO	0,309	0,186	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
18	7919	MACHO	0,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,062	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
19	6317	MACHO	0,204	0,460	0,089	0,103	0,095	0,113	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	6317	HEMBRA	1,524	0,731	0,223	0,114	0,049	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,659
21	6317	MACHO	0,676	0,398	0,130	0,083	0,015	0,020	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
22	6317	HEMBRA	0,564	0,277	0,140	0,081	0,024	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
23	6317	HEMBRA	0,409	0,261	0,060	0,067	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	6317	HEMBRA	0,851	0,339	0,162	0,093	0,033	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25	7429	HEMBRA	1,827	1,255	0,871	0,902	0,601	0,497	0,429	0,251	0,264	0,256	0,154	0,154
26	7429	HEMBRA	1,630	0,917	0,547	0,497	0,513	0,618	0,416	0,432	0,263	0,309	0,356	0,356
27	7429	MACHO	2,150	2,080	0,606	0,978	0,790	0,663	0,455	0,335	0,423	0,299	0,386	0,386
28	7429	MACHO	2,502	2,100	0,816	1,053	0,874	0,974	0,687	0,319	0,644	0,630	0,412	0,412
29	7429	HEMBRA	2,300	1,817	1,221	0,647	0,373	0,328	0,222	0,145	0,072	0,038	0,017	0,017
30	7429	HEMBRA	2,269	1,516	0,555	1,336	0,618	0,469	0,235	0,172	0,112	0,091	0,022	0,022
31	8370	HEMBRA	0,128	0,091	0,049	0,025	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
32	8370	MACHO	0,144	0,052	0,033	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
34	8370	MACHO	0,134	0,072	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
36	8370	MACHO	0,066	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
37	6759	HEMBRA	0,297	0,135	0,055	0,047	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
38	6759	HEMBRA	0,431	0,329	0,138	0,066	0,031	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
39	6759	MACHO	0,417	0,408	0,109	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
40	6759	MACHO	0,383	0,360	0,111	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
41	6759	MACHO	0,300	0,147	0,000	0,000	0,049	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
42	6759	HEMBRA	0,557	0,499	0,159	0,072	0,009	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

11.3. Tabla de medias del valor S/P Apxl por edad, con intervalo de confianza al 95% en el grupo A

Edad	Mean	Std. Err.	IC95% (Media valor S/P)	
			inf	sup
24h	0,733	0,112	0,505	0,960
S1	0,459	0,088	0,280	0,637
S2	0,189	0,044	0,099	0,278
S3	0,175	0,053	0,067	0,282
S4	0,118	0,037	0,044	0,193
S5	0,096	0,036	0,023	0,168
S6	0,063	0,025	0,012	0,114
S7	0,041	0,017	0,007	0,076
S8	0,044	0,021	0,002	0,086
S9	0,041	0,019	0,001	0,080
S10	0,050	0,023	0,004	0,096

11.4. Tabla de valores S/P Apxl por semana agrupados por sexo en el grupo A

SEXO	stats	24h	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
HEMBRA	mean	0,935	0,556	0,277	0,231	0,133	0,112	0,072	0,056	0,039	0,039	0,067
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	sd	0,718	0,516	0,331	0,373	0,222	0,208	0,147	0,120	0,087	0,092	0,172
	min	0,085	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max	2,300	1,817	1,221	1,336	0,618	0,618	0,429	0,432	0,264	0,309	0,659
MACHO	mean	0,568	0,379	0,117	0,128	0,106	0,082	0,055	0,030	0,049	0,042	0,036
	N	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
	sd	0,677	0,590	0,213	0,302	0,245	0,244	0,171	0,096	0,161	0,146	0,118
	min	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max	2,502	2,100	0,816	1,053	0,874	0,974	0,687	0,335	0,644	0,630	0,412
Total	mean	0,733	0,459	0,189	0,175	0,118	0,096	0,063	0,041	0,044	0,041	0,050
	N	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	sd	0,711	0,558	0,280	0,335	0,232	0,226	0,159	0,107	0,131	0,123	0,144
	min	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max	2,502	2,100	1,221	1,336	0,874	0,974	0,687	0,432	0,644	0,630	0,659

11.5. Tabla de valores S/P Apxl a las 24 horas de vida agrupados por camada en el grupo A

CERDA	N	Paridad	Media	Mediana	IQR	Min	Max
6317	6	6	0,705	0,620	0,442	0,204	1,524
6461	6	5	0,988	0,913	0,497	0,621	1,375
6759	6	4	0,397	0,400	0,131	0,297	0,557
7429	6	3	2,113	2,209	0,474	1,630	2,502
7553	6	3	0,410	0,298	0,334	0,000	1,358
7919	6	2	0,195	0,133	0,200	0,086	0,400
8370	4	1	0,118	0,131	0,042	0,066	0,144

11.6. Tabla de valores S/P Apxl por semana agrupados por cerda en el grupo A

CERDA	stats	S/P MADRE	24h	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
6317	mean	0,235	0,705	0,411	0,134	0,090	0,039	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,110
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,459	0,173	0,057	0,017	0,030	0,044	0,001	0,000	0,000	0,000	0,269
	min		0,204	0,261	0,060	0,067	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		1,524	0,731	0,223	0,114	0,095	0,113	0,003	0,000	0,000	0,000	0,659
6461	mean	0,810	0,988	0,494	0,213	0,130	0,097	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,295	0,223	0,141	0,143	0,106	0,017	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
	min		0,621	0,236	0,083	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		1,375	0,762	0,427	0,412	0,253	0,038	0,001	0,002	0,000	0,000	0,000
6759	mean	0,796	0,397	0,313	0,096	0,031	0,020	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,097	0,145	0,058	0,035	0,020	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	min		0,297	0,135	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		0,557	0,499	0,159	0,072	0,049	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7429	mean	1,321	2,113	1,614	0,769	0,902	0,628	0,592	0,407	0,276	0,296	0,270	0,225
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,325	0,473	0,260	0,298	0,182	0,221	0,170	0,108	0,212	0,209	0,183
	min		1,630	0,917	0,547	0,497	0,373	0,328	0,222	0,145	0,072	0,038	0,017
	max		2,502	2,100	1,221	1,336	0,874	0,974	0,687	0,432	0,644	0,630	0,412
7553	mean	0,213	0,410	0,111	0,028	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,490	0,121	0,070	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	min		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		1,358	0,341	0,170	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
7919	mean	0,346	0,195	0,074	0,001	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,128	0,096	0,002	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000	0,000	0,001
	min		0,086	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		0,400	0,205	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,062	0,000	0,000	0,002
8370	mean	0,069	0,118	0,061	0,026	0,006	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	sd		0,035	0,026	0,021	0,013	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	min		0,066	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		0,144	0,091	0,049	0,025	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Total	mean	0,565	0,733	0,459	0,189	0,175	0,118	0,096	0,063	0,041	0,044	0,041	0,050
	N	7	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	sd		0,711	0,558	0,280	0,335	0,232	0,226	0,159	0,107	0,131	0,123	0,144
	min		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		2,502	2,100	1,221	1,336	0,874	0,974	0,687	0,432	0,644	0,630	0,659

11.7. Pruebas de regresión Apxl en el grupo A

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	1.33320495	1	1.33320495	F(1, 38)	=	2.76
Residual	18.3884274	38	.483905984	Prob > F	=	0.1052
Total	19.7216324	39	.505682881	R-squared	=	0.0676
				Adj R-squared	=	0.0431
				Root MSE	=	.69563
H	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
SEXO	.3669703	.2210868	1.66	0.105	-.0805967	.8145372
_cons	.5677188	.1483096	3.83	0.000	.2674818	.8679558

```
. regress H SPMADRE
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	11.5095189	1	11.5095189	F(1, 38)	=	53.26
Residual	8.21211341	38	.216108248	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.5836
				Adj R-squared	=	0.5726
Total	19.7216324	39	.505682881	Root MSE	=	.46487

H	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
SPMADRE	1.303029	.1785505	7.30	0.000	.9415722 1.664485
_cons	-.0031367	.1247944	-0.03	0.980	-.2557696 .2494963

```
. regress VALORSP EDAD
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	12.4042403	1	12.4042403	F(1, 438)	=	101.03
Residual	53.7777531	438	.122780258	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.1874
				Adj R-squared	=	0.1856
Total	66.1819934	439	.150756249	Root MSE	=	.3504

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
EDAD	-.0530956	.0052825	-10.05	0.000	-.0634778 -.0427135
_cons	.4480442	.0312516	14.34	0.000	.3866225 .5094659

```
. regress VALORSP EDAD SPMADRE
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	29.552558	2	14.776279	F(2, 437)	=	176.29
Residual	36.6294354	437	.083820218	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.4465
				Adj R-squared	=	0.4440
Total	66.1819934	439	.150756249	Root MSE	=	.28952

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
EDAD	-.0530956	.0043646	-12.16	0.000	-.0616739 -.0445173
SPMADRE	.4795566	.0335277	14.30	0.000	.413661 .5454521
_cons	.1771754	.0320216	5.53	0.000	.11424 .2401108

Final multivariable fractional polynomial model for VALORSP						
Variable	Initial			Final		
	df	Select	Alpha	Status	df	Powers
SPMADRE	4	1.0000	0.0500	in	4	3 3
EDAD	4	1.0000	0.0500	in	2	-1

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	42.9169242	3	14.3056414	F(3, 436)	=	268.10
Residual	23.2650692	436	.05336025	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.6485
				Adj R-squared	=	0.6460
Total	66.1819934	439	.150756249	Root MSE	=	.231

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
ISPMA_1	.1938386	.0322004	6.02	0.000	.1305513	.2571259
ISPMA_2	.3489563	.1004666	3.47	0.001	.1514973	.5464152
IEDAD_1	.0802132	.0042778	18.75	0.000	.0718055	.088621
_cons	-.0214504	.0140698	-1.52	0.128	-.0491034	.0062027

Deviance: -44.856.

11.8. Pruebas de regresión Apxl en el grupo A, subgrupo Apxl+

regress ValorSP EDAD						
Source	SS	df	MS	Number of obs	=	286
Model	16.3922972	1	16.3922972	F(1, 284)	=	107.27
Residual	43.3982018	284	.15281057	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.2742
				Adj R-squared	=	0.2716
Total	59.790499	285	.209791225	Root MSE	=	.39091

ValorSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
EDAD	-.0757071	.0073096	-10.36	0.000	-.090095	-.0613193
_cons	.6448044	.0432442	14.91	0.000	.5596846	.7299242

. regress ValorSP SPMADRE EDAD						
Source	SS	df	MS	Number of obs	=	286
Model	29.6717252	2	14.8358626	F(2, 283)	=	139.40
Residual	30.1187738	283	.106426763	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.4963
				Adj R-squared	=	0.4927
Total	59.790499	285	.209791225	Root MSE	=	.32623

ValorSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
SPMADRE	.5200337	.0465551	11.17	0.000	.4283955	.6116719
EDAD	-.0757071	.0061002	-12.41	0.000	-.0877146	-.0636997
_cons	.2753959	.0489499	5.63	0.000	.1790438	.371748

Final multivariable fractional polynomial model for ValorSP						
Variable	Initial			Final		
	df	Select	Alpha	Status	df	Powers
SPMADRE	4	1.0000	0.0500	in	4	1 2
EDAD	4	1.0000	0.0500	in	4	-2 -2
Source	SS	df	MS	Number of obs = 286		
Model	44.0516645	4	11.0129161	F(4, 281) = 196.62		
Residual	15.7388345	281	.056010087	Prob > F = 0.0000		
				R-squared = 0.7368		
				Adj R-squared = 0.7330		
Total	59.790499	285	.209791225	Root MSE = .23666		
ValorSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
ISPMA_1	-1.004073	.1536053	-6.54	0.000	-1.306436	-.70171
ISPMA_2	1.014059	.0996998	10.17	0.000	.8178062	1.210313
IEDAD_1	.056397	.006754	8.35	0.000	.0431022	.0696918
IEDAD_2	.0199354	.0028929	6.89	0.000	.0142409	.02563
_cons	-.0437857	.0230594	-1.90	0.059	-.0891768	.0016054

Deviance: -17.727.

11.9. Valor S/P ApXII por animal y edad en el grupo A

RESULTADOS APX II LECHONES GRUPO A (VALOR S/P)													
ID. Lechón	CERDA	SEXO	24H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	7553	MACHO	2,529	2,286	2,366	2,031	1,767	1,839	1,355	1,446	1,496	0,511	0,638
2	7553	HEMBRA	2,240	2,467	2,010	1,857	1,495	1,036	1,171	0,965	0,631	0,317	0,450
3	7553	MACHO	1,435	1,199	1,024	0,877	1,556	0,480	0,527	0,291	0,203	0,038	0,000
4	7553	MACHO	2,433	2,297	1,838	1,330	1,303	1,327	1,087	0,818	0,685	0,397	0,179
5	7553	HEMBRA	2,489	2,548	1,917	1,983	1,519	1,173	0,788	0,781	0,479	0,274	0,235
6	7553	MACHO	2,601	2,381	2,443	2,049	1,355	1,146	1,077	0,670	0,381	0,264	0,282
7	6461	MACHO	2,608	2,245	1,985	1,564	1,507	1,407	1,303	0,414	0,355	0,346	0,091
8	6461	HEMBRA	2,324	1,657	1,962	1,068	0,903	0,826	0,781	0,389	0,190	0,234	0,209
9	6461	HEMBRA	1,951	1,661	0,606	0,635	0,641	0,392	0,199	0,052	0,145	0,143	0,085
10	6461	MACHO	2,368	1,468	1,418	0,993	0,503	0,515	0,498	0,125	0,009	0,109	0,068
11	6461	MACHO	2,595	2,082	1,124	1,131	1,033	0,688	0,380	0,278	0,253	0,072	0,031
12	6461	HEMBRA	1,832	1,232	0,779	0,429	0,366	0,127	0,098	0,119	0,107	0,102	0,120
13	7919	MACHO	3,936	3,965	3,868	3,694	3,754	3,123	2,942	1,519	1,584	0,870	0,697
14	7919	HEMBRA	3,920	3,955	3,842	3,853	3,703	3,516	2,489	0,000	1,363	0,976	1,024
15	7919	MACHO	3,973	3,887	3,659	3,631	3,632	2,919	2,148	1,609	0,999	0,599	0,354
16	7919	MACHO	3,906	3,816	3,872	3,778	3,777	3,289	1,620	1,974	1,488	1,177	1,069
17	7919	MACHO	4,027	4,003	3,971	4,010	3,934	3,615	3,389	3,068	2,178	1,110	1,116
18	7919	MACHO	4,016	3,945	3,938	3,909	3,856	3,302	2,695	1,793	0,000	0,550	0,968
19	6317	MACHO	4,019	4,002	3,947	3,963	3,736	3,747	2,899	3,654	1,854	1,339	0,997
20	6317	HEMBRA	4,050	4,016	3,968	3,902	3,889	3,629	2,822	2,739	2,590	1,646	1,432
21	6317	MACHO	3,710	3,653	3,296	2,869	2,384	2,093	1,874	0,834	0,520	0,373	0,302
22	6317	HEMBRA	3,722	3,601	3,452	3,055	2,164	1,984	1,212	1,704	0,921	0,582	0,514
23	6317	HEMBRA	3,637	3,546	2,873	2,924	2,705	2,200	1,610	1,286	0,832	0,708	0,784
24	6317	HEMBRA	3,739	3,616	3,553	3,542	3,488	2,593	1,459	1,072	1,193	0,550	0,380
25	7429	HEMBRA	3,107	2,778	2,074	1,837	1,117	1,091	0,841	0,561	0,489	0,231	0,568
26	7429	HEMBRA	2,480	1,927	0,982	1,166	0,669	0,742	0,463	0,595	0,129	0,119	0,096
27	7429	MACHO	3,412	2,841	1,547	1,770	1,291	1,303	0,738	0,335	0,248	0,083	0,138
28	7429	MACHO	3,102	2,904	1,546	1,808	1,460	1,073	1,070	0,000	0,621	0,665	0,271
29	7429	HEMBRA	2,813	2,565	2,177	1,630	1,139	0,959	0,695	0,402	0,250	0,180	0,079
30	7429	HEMBRA	2,642	2,529	1,247	1,947	1,138	0,743	0,731	0,247	0,253	0,159	0,182
31	8370	HEMBRA	1,516	1,454	1,270	1,058	0,601	0,305	0,251	0,153	0,083	0,038	0,000
32	8370	MACHO	1,712	1,504	1,276	1,055	0,580	0,384	0,181	0,117	0,004	0,000	0,000
34	8370	MACHO	1,635	1,474	0,801	0,553	0,427	0,432	0,298	0,245	0,182	0,208	0,202
36	8370	MACHO	2,003	1,250	0,914	0,903	0,510	0,422	0,212	0,202	0,169	0,167	0,234
37	6759	HEMBRA	2,877	2,787	1,907	1,188	1,053	1,306	0,633	0,429	0,314	0,308	0,301
38	6759	HEMBRA	2,911	2,819	2,519	2,144	1,563	1,226	0,692	0,644	0,413	0,348	0,340
39	6759	MACHO	3,030	2,955	2,709	1,674	1,372	1,270	0,639	0,478	0,224	0,219	0,250
40	6759	MACHO	3,007	2,953	2,235	1,810	1,656	1,302	2,316	0,523	0,368	0,229	0,238
41	6759	MACHO	3,016	2,813	1,962	1,346	1,126	0,922	0,503	0,165	0,195	0,104	0,177
42	6759	HEMBRA	2,964	2,969	2,709	2,155	1,388	1,146	0,783	0,319	0,366	0,167	0,214

11.10. Tabla de medias del valor S/P ApXII por edad, con intervalo de confianza al 95% en el grupo A

Edad	Media	Std. Err.	IC95% (Media valor S/P)	
			inf	sup
24H	2,907	0,125	2,654	3,160
S1	2,701	0,144	2,409	2,993
S2	2,290	0,170	1,946	2,633
S3	2,078	0,176	1,722	2,434
S4	1,801	0,186	1,426	2,177
S5	1,540	0,171	1,194	1,886
S6	1,187	0,141	0,901	1,473
S7	0,825	0,136	0,549	1,102
S8	0,619	0,100	0,416	0,822
S9	0,413	0,061	0,289	0,537
S10	0,383	0,057	0,267	0,498

11.11. Tabla de valores S/P ApXII por semana agrupados por sexo en el grupo A

SEXO	stats	H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
HEMBRA	mean	2,845	2,674	2,214	2,021	1,641	1,389	0,984	0,692	0,597	0,393	0,390
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	sd	0,744	0,853	1,032	1,059	1,099	1,013	0,730	0,682	0,623	0,395	0,371
	min	1,516	1,232	0,606	0,429	0,366	0,127	0,098	0,000	0,083	0,038	0,000
	max	4,050	4,016	3,968	3,902	3,889	3,629	2,822	2,739	2,590	1,646	1,432
MACHO	mean	2,958	2,724	2,352	2,125	1,933	1,664	1,352	0,935	0,638	0,429	0,377
	N	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
	sd	0,840	0,979	1,127	1,178	1,244	1,145	0,994	0,990	0,658	0,389	0,362
	min	1,435	1,199	0,801	0,553	0,427	0,384	0,181	0,000	0,000	0,000	0,000
	max	4,027	4,003	3,971	4,010	3,934	3,747	3,389	3,654	2,178	1,339	1,116
Total	mean	2,907	2,701	2,290	2,078	1,801	1,540	1,187	0,825	0,619	0,413	0,383
	N	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	sd	0,790	0,913	1,074	1,113	1,175	1,083	0,894	0,863	0,634	0,387	0,361
	min	1,435	1,199	0,606	0,429	0,366	0,127	0,098	0,000	0,000	0,000	0,000
	max	4,050	4,016	3,971	4,010	3,934	3,747	3,389	3,654	2,590	1,646	1,432

11.12. Tabla de valores S/P ApXII a las 24 horas de vida agrupados por camada en el grupo A

CERDA	N	Paridad	Media	Mediana	IQR	Min	Max
6317	6	6	3,813	3,730	0,309	3,637	4,050
6461	6	5	2,280	2,346	0,644	1,832	2,608
6759	6	4	2,967	2,986	0,105	2,877	3,030
7429	6	3	2,926	2,957	0,465	2,480	3,412
7553	6	3	2,288	2,461	0,289	1,435	2,601
7919	6	2	3,963	3,955	0,096	3,906	4,027
8370	4	1	1,716	1,673	0,282	1,516	2,003

11.13. Tabla de valores S/P ApxII por semana agrupados por cerda en el grupo A

CERDA	stats	S/P MADRE	H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
6317	mean	2,915	3,813	3,739	3,515	3,376	3,061	2,708	1,979	1,882	1,318	0,866	0,735
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,176	0,212	0,414	0,493	0,737	0,788	0,716	1,097	0,768	0,506	0,429
	min		3,637	3,546	2,873	2,869	2,164	1,984	1,212	0,834	0,520	0,373	0,302
	max		4,050	4,016	3,968	3,963	3,889	3,747	2,899	3,654	2,590	1,646	1,432
6461	mean	2,452	2,280	1,724	1,312	0,970	0,825	0,659	0,543	0,229	0,176	0,168	0,101
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,324	0,378	0,584	0,398	0,415	0,439	0,442	0,153	0,120	0,103	0,061
	min		1,832	1,232	0,606	0,429	0,366	0,127	0,098	0,052	0,009	0,072	0,031
	max		2,608	2,245	1,985	1,564	1,507	1,407	1,303	0,414	0,355	0,346	0,209
6759	mean	3,126	2,967	2,883	2,340	1,719	1,359	1,195	0,928	0,426	0,313	0,229	0,253
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,062	0,085	0,359	0,401	0,236	0,146	0,686	0,167	0,087	0,089	0,059
	min		2,877	2,787	1,907	1,188	1,053	0,922	0,503	0,165	0,195	0,104	0,177
	max		3,030	2,969	2,709	2,155	1,656	1,306	2,316	0,644	0,413	0,348	0,340
7429	mean	2,567	2,926	2,591	1,596	1,693	1,136	0,985	0,756	0,357	0,332	0,240	0,222
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,344	0,358	0,463	0,278	0,263	0,218	0,198	0,219	0,184	0,215	0,183
	min		2,480	1,927	0,982	1,166	0,669	0,742	0,463	0,000	0,129	0,083	0,079
	max		3,412	2,904	2,177	1,947	1,460	1,303	1,070	0,595	0,621	0,665	0,568
7553	mean	1,877	2,288	2,196	1,933	1,688	1,499	1,167	1,001	0,829	0,646	0,300	0,297
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,435	0,499	0,508	0,479	0,164	0,440	0,296	0,378	0,452	0,158	0,222
	min		1,435	1,199	1,024	0,877	1,303	0,480	0,527	0,291	0,203	0,038	0,000
	max		2,601	2,548	2,443	2,049	1,767	1,839	1,355	1,446	1,496	0,511	0,638
7919	mean	2,675	3,963	3,929	3,858	3,813	3,776	3,294	2,547	1,660	1,270	0,881	0,871
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,051	0,067	0,109	0,140	0,108	0,254	0,618	0,987	0,731	0,260	0,293
	min		3,906	3,816	3,659	3,631	3,632	2,919	1,620	0,000	0,000	0,550	0,354
	max		4,027	4,003	3,971	4,010	3,934	3,615	3,389	3,068	2,178	1,177	1,116
8370	mean	1,027	1,716	1,420	1,065	0,892	0,530	0,386	0,235	0,179	0,110	0,103	0,109
	N	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	sd		0,207	0,116	0,244	0,237	0,079	0,058	0,050	0,056	0,083	0,100	0,127
	min		1,516	1,250	0,801	0,553	0,427	0,305	0,181	0,117	0,004	0,000	0,000
	max		2,003	1,504	1,276	1,058	0,601	0,432	0,298	0,245	0,182	0,208	0,234
Total	mean	2,445	2,907	2,701	2,290	2,078	1,801	1,540	1,187	0,825	0,619	0,413	0,383
	N	7	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	sd		0,790	0,913	1,074	1,113	1,175	1,083	0,894	0,863	0,634	0,387	0,361
	min		1,435	1,199	0,606	0,429	0,366	0,127	0,098	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		4,050	4,016	3,971	4,010	3,934	3,747	3,389	3,654	2,590	1,646	1,432

11.14. Pruebas de regresión ApxII en el grupo A

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	.125693311	1	.125693311	F(1, 38)	=	0.20
Residual	24.2209261	38	.637392793	Prob > F	=	0.6595
Total	24.3466194	39	.624272293	R-squared	=	0.0052
				Adj R-squared	=	-0.0210
				Root MSE	=	.79837

H	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
SEX	-.1126778	.2537383	-0.44	0.660	-.6263441 .4009884
_cons	2.957801	.1702128	17.38	0.000	2.613223 3.302379

```
. regress H SPMADRE
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	2.78520209	1	2.78520209	F(1, 38)	=	21.26
Residual	4.97775037	38	.130993431	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.3588
				Adj R-squared	=	0.3419
Total	7.76295246	39	.199050063	Root MSE	=	.36193

H	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
SPMADRE	.5407769	.1172774	4.61	0.000	.3033611 .7781926
_cons	.5908819	.1240476	4.76	0.000	.3397608 .8420031

```
. regress VALORSP EDAD
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	33.9215309	1	33.9215309	F(1, 438)	=	505.07
Residual	29.4168899	438	.067161849	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.5356
				Adj R-squared	=	0.5345
Total	63.3384208	439	.144278863	Root MSE	=	.25916

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
EDAD	-.0878034	.0039069	-22.47	0.000	-.0954821 -.0801248
_cons	.7696079	.0231137	33.30	0.000	.7241804 .8150354

```
. regress VALORSP SPMADRE EDAD
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	37.4120339	2	18.7060169	F(2, 437)	=	315.30
Residual	25.9263869	437	.059328117	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.5907
				Adj R-squared	=	0.5888
Total	63.3384208	439	.144278863	Root MSE	=	.24357

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
SPMADRE	.1825313	.0237971	7.67	0.000	.1357604 .2293023
EDAD	-.0878034	.003672	-23.91	0.000	-.0950204 -.0805864
_cons	.5983115	.0311554	19.20	0.000	.5370784 .6595447

11.15. Valor S/P ApxIII por animal y edad en el grupo A

RESULTADOS APX III LECHONES GRUPO A (VALOR S/P)													
ID. Lechón	CERDA	SEXO	24H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	7553	MACHO	0,987	0,429	0,324	0,250	0,255	0,145	0,102	0,061	0,078	0,060	0,076
2	7553	HEMBRA	0,432	0,374	0,306	0,178	0,136	0,113	0,154	0,151	0,169	0,107	0,083
3	7553	MACHO	0,150	0,134	0,079	0,066	0,092	0,080	0,035	0,057	0,058	0,060	0,063
4	7553	MACHO	0,700	0,521	0,305	0,186	0,175	0,191	0,168	0,163	0,168	0,133	0,184
5	7553	HEMBRA	1,279	0,886	0,303	0,310	0,311	0,228	0,177	0,028	0,054	0,075	0,083
6	7553	MACHO	1,120	0,589	0,357	0,307	0,202	0,181	0,212	0,195	0,047	0,043	0,081
7	6461	MACHO	1,685	0,823	0,690	0,462	0,378	0,317	0,146	0,180	0,201	0,000	0,000
8	6461	HEMBRA	1,110	0,904	0,677	0,356	0,302	0,228	0,196	0,176	0,120	0,000	0,000
9	6461	HEMBRA	1,283	1,053	0,425	0,206	0,149	0,151	0,180	0,060	0,105	0,118	0,100
10	6461	MACHO	1,166	0,721	0,413	0,373	0,367	0,318	0,234	0,116	0,099	0,087	0,006
11	6461	MACHO	1,542	0,688	0,448	0,377	0,329	0,201	0,115	0,063	0,033	0,053	0,015
12	6461	HEMBRA	1,317	0,696	0,318	0,225	0,224	0,086	0,124	0,067	0,128	0,054	0,081
13	7919	MACHO	0,781	0,605	0,361	0,316	0,213	0,256	0,194	0,243	0,182	0,109	0,041
14	7919	HEMBRA	1,371	1,290	0,656	0,463	0,291	0,307	0,182	0,121	0,056	0,081	0,040
15	7919	MACHO	1,092	0,580	0,296	0,327	0,222	0,254	0,171	0,129	0,118	0,100	0,072
16	7919	MACHO	0,936	0,853	0,382	0,330	0,423	0,249	0,307	0,204	0,169	0,114	0,105
17	7919	MACHO	0,912	0,372	0,247	0,195	0,134	0,100	0,177	0,131	0,087	0,108	0,084
18	7919	MACHO	0,821	0,361	0,280	0,190	0,309	0,290	0,377	0,263	0,198	0,090	0,046
19	6317	MACHO	1,008	0,799	0,624	0,617	0,514	0,346	0,200	0,073	0,093	0,073	0,060
20	6317	HEMBRA	1,801	1,390	0,880	0,684	0,529	0,386	0,228	0,247	0,104	0,123	0,147
21	6317	MACHO	1,551	1,434	0,951	0,647	0,454	0,293	0,225	0,148	0,074	0,077	0,078
22	6317	HEMBRA	1,589	1,185	0,886	0,649	0,522	0,283	0,137	0,163	0,089	0,046	0,064
23	6317	HEMBRA	1,674	1,224	0,579	0,553	0,308	0,226	0,068	0,064	0,036	0,049	0,038
24	6317	HEMBRA	1,804	1,626	1,140	0,894	0,567	0,331	0,151	0,125	0,084	0,093	0,043
25	7429	HEMBRA	1,149	0,770	0,724	0,401	0,310	0,245	0,178	0,091	0,083	0,065	0,059
26	7429	HEMBRA	0,630	0,444	0,232	0,232	0,147	0,129	0,085	0,065	0,029	0,049	0,036
27	7429	MACHO	1,234	0,932	0,427	0,364	0,249	0,130	0,139	0,173	0,063	0,038	0,064
28	7429	MACHO	1,176	0,734	0,334	0,420	0,322	0,283	0,164	0,000	0,163	0,165	0,081
29	7429	HEMBRA	1,681	1,164	0,675	0,514	0,340	0,281	0,189	0,044	0,095	0,086	0,058
30	7429	HEMBRA	2,097	1,335	0,398	0,810	0,494	0,390	0,230	0,125	0,072	0,082	0,000
31	8370	HEMBRA	0,634	0,344	0,129	0,136	1,275	0,028	0,006	0,039	0,014	0,062	0,000
32	8370	MACHO	0,564	0,360	0,141	0,163	0,095	0,150	0,053	0,036	0,001	0,140	0,045
34	8370	MACHO	0,425	0,275	0,218	0,054	0,044	0,113	0,035	0,077	0,006	0,027	0,147
36	8370	MACHO	0,313	0,115	0,080	0,037	0,000	0,033	0,027	0,031	0,005	0,000	0,057
37	6759	HEMBRA	0,736	0,576	0,343	0,178	0,149	0,128	0,045	0,055	0,032	0,061	0,084
38	6759	HEMBRA	1,398	0,862	0,556	0,529	0,210	0,258	0,157	0,075	0,053	0,041	0,029
39	6759	MACHO	0,931	0,718	0,276	0,165	0,209	0,177	0,068	0,017	0,000	0,019	0,043
40	6759	MACHO	0,978	0,993	0,460	0,279	0,278	0,179	0,171	0,073	0,066	0,061	0,017
41	6759	MACHO	0,818	0,485	0,345	0,198	0,197	0,090	0,102	0,020	0,025	0,048	0,061
42	6759	HEMBRA	1,059	0,969	0,409	0,324	0,262	0,076	0,091	0,068	0,202	0,123	0,081

11.16. Tabla de medias del valor S/P ApxIII por edad, con intervalo de confianza al 95% en el grupo A

Edad	Media	Std. Err.	IC95% (Media valor S/P)	
			inf	sup
24H	1,098	0,071	0,956	1,241
S1	0,765	0,059	0,647	0,884
S2	0,442	0,038	0,364	0,519
S3	0,349	0,032	0,284	0,414
S4	0,300	0,033	0,233	0,366
S5	0,206	0,015	0,175	0,237
S6	0,150	0,012	0,125	0,174
S7	0,105	0,011	0,084	0,127
S8	0,086	0,009	0,068	0,105
S9	0,073	0,006	0,060	0,085
S10	0,061	0,006	0,048	0,074

11.17. Tabla de valores S/P Ap XIII por semana agrupados por sexo en el grupo A

SEXO	stats	H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
HEMBRA	mean	1,280	0,950	0,535	0,424	0,363	0,215	0,143	0,098	0,085	0,073	0,057
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	sd	0,460	0,368	0,265	0,228	0,266	0,107	0,062	0,058	0,049	0,032	0,038
	min	0,432	0,344	0,129	0,136	0,136	0,028	0,006	0,028	0,014	0,000	0,000
	max	2,097	1,626	1,140	0,894	1,275	0,390	0,230	0,247	0,202	0,123	0,147
MACHO	mean	0,950	0,615	0,365	0,288	0,248	0,199	0,155	0,112	0,088	0,073	0,065
	N	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
	sd	0,383	0,304	0,197	0,161	0,133	0,088	0,088	0,076	0,067	0,044	0,043
	min	0,150	0,115	0,079	0,037	0,000	0,033	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000
	max	1,685	1,434	0,951	0,647	0,514	0,346	0,377	0,263	0,201	0,165	0,184
Total	mean	1,098	0,765	0,442	0,349	0,300	0,206	0,150	0,105	0,086	0,073	0,061
	N	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	sd	0,446	0,371	0,243	0,203	0,209	0,096	0,077	0,068	0,059	0,039	0,040
	min	0,150	0,115	0,079	0,037	0,000	0,028	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
	max	2,097	1,626	1,140	0,894	1,275	0,390	0,377	0,263	0,202	0,165	0,184

11.18. Tabla de valores S/P Ap XIII a las 24 horas de vida agrupados por camada en el grupo

A

CERDA	N	Paridad	Media	Mediana	IQR	Min	Max
6317	6	6	1,571	1,631	0,250	1,008	1,804
6461	6	5	1,351	1,300	0,376	1,110	1,685
6759	6	4	0,987	0,955	0,241	0,736	1,398
7429	6	3	1,328	1,205	0,532	0,630	2,097
7553	6	3	0,778	0,843	0,689	0,150	1,279
7919	6	2	0,985	0,924	0,271	0,781	1,371
8370	4	1	0,484	0,494	0,230	0,313	0,634

11.19. Tabla de valores S/P por semana ApxIII agrupados por cerda en el grupo A

CERDA	stats	S/P MADRE	H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
6317	mean	1,926	1,571	1,276	0,843	0,674	0,482	0,311	0,168	0,137	0,080	0,077	0,072
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,295	0,282	0,210	0,116	0,093	0,056	0,062	0,067	0,024	0,029	0,039
	min		1,008	0,799	0,579	0,553	0,308	0,226	0,068	0,064	0,036	0,046	0,038
	max		1,804	1,626	1,140	0,894	0,567	0,386	0,228	0,247	0,104	0,123	0,147
6461	mean	0,752	1,351	0,814	0,495	0,333	0,291	0,217	0,166	0,110	0,114	0,052	0,034
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,222	0,144	0,152	0,099	0,089	0,092	0,046	0,056	0,054	0,047	0,045
	min		1,110	0,688	0,318	0,206	0,149	0,086	0,115	0,060	0,033	0,000	0,000
	max		1,685	1,053	0,690	0,462	0,378	0,318	0,234	0,180	0,201	0,118	0,100
6759	mean	1,004	0,987	0,767	0,398	0,279	0,218	0,151	0,106	0,051	0,063	0,059	0,053
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,232	0,209	0,100	0,137	0,047	0,067	0,050	0,026	0,072	0,035	0,027
	min		0,736	0,485	0,276	0,165	0,149	0,076	0,045	0,017	0,000	0,019	0,017
	max		1,398	0,993	0,556	0,529	0,278	0,258	0,171	0,075	0,202	0,123	0,084
7429	mean	1,213	1,328	0,897	0,465	0,457	0,310	0,243	0,164	0,083	0,084	0,081	0,050
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,503	0,320	0,194	0,196	0,114	0,100	0,049	0,061	0,044	0,045	0,028
	min		0,630	0,444	0,232	0,232	0,147	0,129	0,085	0,000	0,029	0,038	0,000
	max		2,097	1,335	0,724	0,810	0,494	0,390	0,230	0,173	0,163	0,165	0,081
7553	mean	0,565	0,778	0,489	0,279	0,216	0,195	0,156	0,141	0,109	0,096	0,080	0,095
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,432	0,250	0,100	0,093	0,079	0,054	0,063	0,069	0,057	0,034	0,044
	min		0,150	0,134	0,079	0,066	0,092	0,080	0,035	0,028	0,047	0,043	0,063
	max		1,279	0,886	0,357	0,310	0,311	0,228	0,212	0,195	0,169	0,133	0,184
7919	mean	0,523	0,985	0,677	0,370	0,304	0,265	0,242	0,235	0,182	0,135	0,100	0,065
	N	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,218	0,351	0,149	0,102	0,099	0,074	0,086	0,063	0,057	0,012	0,027
	min		0,781	0,361	0,247	0,190	0,134	0,100	0,171	0,121	0,056	0,081	0,040
	max		1,371	1,290	0,656	0,463	0,423	0,307	0,377	0,263	0,198	0,114	0,105
8370	mean	0,410	0,484	0,274	0,142	0,098	0,353	0,081	0,030	0,046	0,007	0,057	0,062
	N	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	sd		0,143	0,112	0,057	0,062	0,616	0,060	0,020	0,021	0,005	0,061	0,061
	min		0,313	0,115	0,080	0,037	0,000	0,028	0,006	0,031	0,001	0,000	0,000
	max		0,634	0,360	0,218	0,163	1,275	0,150	0,053	0,077	0,014	0,140	0,147
Total	mean	0,9384491	1,098	0,765	0,442	0,349	0,300	0,206	0,150	0,105	0,086	0,073	0,061
	N	7	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	sd		0,446	0,371	0,243	0,203	0,209	0,096	0,077	0,068	0,059	0,039	0,040
	min		0,150	0,115	0,079	0,037	0,000	0,028	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		2,097	1,626	1,140	0,894	1,275	0,390	0,377	0,263	0,202	0,165	0,184

11.20. Pruebas de regresión ApxIII en el grupo A

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	1.08327646	1	1.08327646	F(1, 38)	=	6.16
Residual	6.679676	38	.175780947	Prob > F	=	0.0176
Total	7.76295246	39	.199050063	R-squared	=	0.1395
				Adj R-squared	=	0.1169
				Root MSE	=	.41926
H	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
SEX	.3307898	.1332503	2.48	0.018	.0610386	.600541
_cons	.9495181	.089387	10.62	0.000	.7685635	1.130473

```
. regress H SPMADRE
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	2.09528773	1	2.09528773	F(1, 38)	=	18.89
Residual	4.21428162	38	.110902148	Prob > F	=	0.0001
				R-squared	=	0.3321
				Adj R-squared	=	0.3145
Total	6.30956935	39	.161783829	Root MSE	=	.33302

H	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
SPMADRE	.5218818	.1200661	4.35	0.000	.2788207 .7649428
_cons	.5899548	.1250415	4.72	0.000	.3368215 .8430881

```
. regress VALORSP EDAD
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	26.9434652	1	26.9434652	F(1, 438)	=	493.16
Residual	23.9297577	438	.05463415	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.5296
				Adj R-squared	=	0.5285
Total	50.8732228	439	.115884334	Root MSE	=	.23374

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
EDAD	-.0782529	.0035238	-22.21	0.000	-.0851785 -.0713273
_cons	.7909872	.0208468	37.94	0.000	.7500149 .8319594

```
. regress VALORSP EDAD SPMADRE
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	29.823007	2	14.9115035	F(2, 437)	=	309.56
Residual	21.0502158	437	.04816983	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.5862
				Adj R-squared	=	0.5843
Total	50.8732228	439	.115884334	Root MSE	=	.21948

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
EDAD	-.0782529	.0033087	-23.65	0.000	-.0847559 -.0717499
SPMADRE	.1844657	.0238584	7.73	0.000	.1375742 .2313572
_cons	.6167408	.0298508	20.66	0.000	.5580719 .6754098

Final multivariable fractional polynomial model for VALORSP						
Variable	Initial			Final		
	df	Select	Alpha	Status	df	Powers
SPMADRE	4	1.0000	0.0500	in	4	-2 3
EDAD	4	1.0000	0.0500	in	4	-2 -1
Source	SS	df	MS	Number of obs = 440		
Model	47.1432404	4	11.7858101	F(4, 435) = 316.57		
Residual	16.1951804	435	.0372303	Prob > F = 0.0000		
				R-squared = 0.7443		
				Adj R-squared = 0.7420		
Total	63.3384208	439	.144278863	Root MSE = .19295		
VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
ISPMA_1	-.0268553	.0067379	-3.99	0.000	-.0400983	-.0136124
ISPMA_2	.0236427	.0048781	4.85	0.000	.0140551	.0332302
IEDAD_1	-.0102039	.0014083	-7.25	0.000	-.0129719	-.0074359
IEDAD_2	.2270147	.0153095	14.83	0.000	.196925	.2571044
_cons	.2111294	.0139776	15.10	0.000	.1836573	.2386014

11.21. Valor S/P ApXIV por animal y edad en el grupo A

RESULTADOS APX IV LECHONES GRUPO A (VALOR S/P)													
ID. Lechón	CERDA	SEXO	24H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	7553	MACHO	1,698	1,676	1,583	1,537	1,451	1,444	1,321	1,338	1,097	1,104	1,096
2	7553	HEMBRA	1,623	1,567	1,558	1,470	1,411	1,352	1,140	1,202	1,081	0,930	0,813
3	7553	MACHO	1,590	1,427	1,378	1,245	1,209	1,161	0,943	0,705	0,617	0,402	0,333
4	7553	MACHO	1,861	1,721	1,665	1,628	1,487	1,483	1,427	1,313	1,159	1,057	1,010
5	7553	HEMBRA	1,428	1,321	0,970	0,855	0,735	0,628	0,460	0,300	0,192	0,111	0,029
6	7553	MACHO	1,831	1,750	1,691	1,625	1,431	1,465	1,360	1,222	1,093	0,922	0,827
7	6461	MACHO	1,654	1,579	1,503	1,487	1,436	1,285	1,176	1,001	0,434	0,653	0,558
8	6461	HEMBRA	1,686	1,604	1,523	1,405	1,338	1,194	1,148	0,907	0,748	0,576	0,649
9	6461	HEMBRA	1,692	1,589	1,381	1,368	1,337	1,190	1,079	0,833	0,771	0,536	0,378
10	6461	MACHO	1,699	1,629	1,559	1,519	1,392	1,225	1,188	1,238	0,802	0,631	0,472
11	6461	MACHO	1,683	1,662	1,517	1,520	1,450	1,380	1,247	0,842	0,938	0,553	0,497
12	6461	HEMBRA	1,653	1,460	1,329	1,156	1,051	0,975	0,858	0,717	0,480	0,263	0,225
13	7919	MACHO	1,969	1,890	1,847	1,829	1,784	1,737	1,644	1,463	1,648	1,281	1,253
14	7919	HEMBRA	1,892	1,888	1,881	1,881	1,840	1,791	1,598	1,533	1,399	1,298	1,250
15	7919	MACHO	1,979	1,929	1,784	1,792	1,745	1,637	1,577	1,557	1,430	1,263	0,838
16	7919	MACHO	1,983	1,895	1,854	1,822	1,770	1,724	1,674	1,595	1,484	1,056	0,932
17	7919	MACHO	1,587	1,782	1,770	1,808	1,786	1,740	1,752	1,661	1,482	1,356	1,284
18	7919	MACHO	1,908	1,876	1,827	1,804	1,736	1,673	1,619	1,562	1,422	1,328	1,154
19	6317	MACHO	1,921	1,877	1,578	1,547	1,476	1,466	1,168	1,027	0,863	0,766	0,606
20	6317	HEMBRA	1,813	1,694	1,660	1,613	1,507	1,363	1,277	1,186	1,049	0,807	0,698
21	6317	MACHO	1,841	1,726	1,654	1,583	1,497	1,438	1,290	1,137	0,951	0,845	0,740
22	6317	HEMBRA	1,787	1,752	1,634	1,584	1,501	1,405	1,286	1,138	0,953	0,820	0,702
23	6317	HEMBRA	1,734	1,679	1,629	1,566	1,470	1,426	1,241	1,097	0,896	0,685	0,586
24	6317	HEMBRA	1,850	1,749	1,660	1,558	1,495	1,473	1,319	1,135	0,891	0,799	0,698
25	7429	HEMBRA	1,910	1,829	1,794	1,772	1,735	1,626	1,514	1,312	1,333	1,091	1,008
26	7429	HEMBRA	1,885	1,657	1,631	1,582	1,545	1,438	1,415	1,069	0,967	0,820	0,667
27	7429	MACHO	1,960	1,801	1,756	1,753	1,693	1,593	1,489	1,350	1,261	1,001	0,854
28	7429	MACHO	1,888	1,868	1,825	1,800	1,750	1,700	1,649	1,447	1,275	1,193	0,982
29	7429	HEMBRA	1,898	1,873	1,822	1,809	1,746	1,623	1,497	1,307	1,194	0,980	0,771
30	7429	HEMBRA	1,797	1,837	1,838	1,748	1,695	1,628	1,528	1,316	1,216	0,935	0,852
31	8370	HEMBRA	0,336	0,249	0,120	0,109	0,044	0,072	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
32	8370	MACHO	0,409	0,237	0,089	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
34	8370	MACHO	0,634	0,251	0,273	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
36	8370	MACHO	1,235	1,131	0,797	0,801	0,643	0,589	0,454	0,415	0,338	0,120	0,100
37	6759	HEMBRA	1,798	1,709	1,599	1,611	1,571	1,351	1,225	1,039	0,941	0,814	0,636
38	6759	HEMBRA	1,844	1,798	1,746	1,661	1,590	1,519	1,322	1,283	1,070	0,898	0,649
39	6759	MACHO	1,812	1,740	1,553	1,563	1,495	1,463	1,338	1,188	1,016	0,698	0,776
40	6759	MACHO	1,787	1,703	1,633	1,632	1,510	1,436	1,315	1,219	1,020	0,819	0,438
41	6759	MACHO	1,718	1,665	1,535	1,469	1,403	1,330	1,092	0,762	0,661	0,613	0,545
42	6759	HEMBRA	1,818	1,686	1,613	1,588	1,572	1,420	1,259	1,019	0,994	0,610	0,506

11.22. Tabla de medias del valor S/P ApxIV por edad, con intervalo de confianza al 95% en el grupo A

Edad	Media	Std. Err.	IC95% (Media valor S/P)	
			inf	sup
24H	1,677	0,061	1,555	1,800
S1	1,594	0,067	1,459	1,729
S2	1,502	0,070	1,360	1,643
S3	1,454	0,074	1,304	1,603
S4	1,383	0,074	1,234	1,533
S5	1,311	0,071	1,167	1,455
S6	1,197	0,070	1,056	1,339
S7	1,061	0,068	0,924	1,198
S8	0,929	0,066	0,796	1,062
S9	0,766	0,059	0,646	0,886
S10	0,660	0,055	0,549	0,771

11.23. Tabla de valores S/P ApxIV por semana agrupados por sexo en el grupo A

SEXO	stats	H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
HEMBRA	mean	1,691	1,608	1,522	1,463	1,399	1,304	1,176	1,022	0,899	0,721	0,618
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	sd	0,359	0,369	0,410	0,415	0,425	0,405	0,396	0,374	0,364	0,332	0,311
	min	0,336	0,249	0,120	0,109	0,044	0,072	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max	1,910	1,888	1,881	1,881	1,840	1,791	1,598	1,533	1,399	1,298	1,250
MACHO	mean	1,666	1,582	1,485	1,446	1,370	1,317	1,215	1,093	0,954	0,803	0,695
	N	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
	sd	0,410	0,468	0,478	0,515	0,509	0,495	0,487	0,473	0,462	0,410	0,378
	min	0,409	0,237	0,089	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max	1,983	1,929	1,854	1,829	1,786	1,740	1,752	1,661	1,648	1,356	1,284
Total	mean	1,677	1,594	1,502	1,454	1,383	1,311	1,197	1,061	0,929	0,766	0,660
	N	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	sd	0,383	0,421	0,444	0,467	0,467	0,451	0,443	0,428	0,416	0,374	0,347
	min	0,336	0,237	0,089	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max	1,983	1,929	1,881	1,881	1,840	1,791	1,752	1,661	1,648	1,356	1,284

11.24. Tabla de valores S/P ApxIV a las 24 horas de vida agrupados por camada en el grupo

A

CERDA	N	Paridad	Media	Mediana	IQR	Min	Max
6317	6	6	1,824	1,827	0,063	1,734	1,921
6461	6	5	1,678	1,684	0,038	1,653	1,699
6759	6	4	1,796	1,805	0,031	1,718	1,844
7429	6	3	1,890	1,893	0,024	1,797	1,960
7553	6	3	1,672	1,661	0,241	1,428	1,861
7919	6	2	1,886	1,938	0,087	1,587	1,983
8370	4	1	0,653	0,521	0,562	0,336	1,235

11.25. Tabla de valores S/P ApxIV por semana agrupados por cerda en el grupo A

CERDA	stats	S/P MADRE	H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
6317	mean	1,544	1,824	1,746	1,636	1,575	1,491	1,429	1,263	1,120	0,934	0,787	0,672
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,063	0,070	0,031	0,023	0,015	0,041	0,053	0,054	0,066	0,056	0,061
	min		1,734	1,679	1,578	1,547	1,470	1,363	1,168	1,027	0,863	0,685	0,586
	max		1,921	1,877	1,660	1,613	1,507	1,473	1,319	1,186	1,049	0,845	0,740
6461	mean	1,577	1,678	1,587	1,469	1,409	1,334	1,208	1,116	0,923	0,695	0,535	0,463
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,020	0,069	0,092	0,139	0,147	0,135	0,138	0,180	0,197	0,141	0,148
	min		1,653	1,460	1,329	1,156	1,051	0,975	0,858	0,717	0,434	0,263	0,225
	max		1,699	1,662	1,559	1,520	1,450	1,380	1,247	1,238	0,938	0,653	0,649
6759	mean	1,474	1,796	1,717	1,613	1,588	1,524	1,420	1,259	1,085	0,950	0,742	0,592
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,043	0,047	0,075	0,067	0,070	0,070	0,092	0,189	0,148	0,120	0,120
	min		1,718	1,665	1,535	1,469	1,403	1,330	1,092	0,762	0,661	0,610	0,438
	max		1,844	1,798	1,746	1,661	1,590	1,519	1,338	1,283	1,070	0,898	0,776
7429	mean	1,756	1,890	1,811	1,778	1,744	1,694	1,601	1,515	1,300	1,207	1,003	0,856
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,053	0,080	0,078	0,083	0,077	0,088	0,076	0,125	0,128	0,129	0,128
	min		1,797	1,657	1,631	1,582	1,545	1,438	1,415	1,069	0,967	0,820	0,667
	max		1,960	1,873	1,838	1,809	1,750	1,700	1,649	1,447	1,333	1,193	1,008
7553	mean	1,546	1,672	1,577	1,474	1,393	1,287	1,256	1,109	1,013	0,873	0,754	0,685
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,162	0,172	0,270	0,299	0,288	0,330	0,363	0,419	0,388	0,403	0,416
	min		1,428	1,321	0,970	0,855	0,735	0,628	0,460	0,300	0,192	0,111	0,029
	max		1,861	1,750	1,691	1,628	1,487	1,483	1,427	1,338	1,159	1,104	1,096
7919	mean	1,653	1,886	1,877	1,827	1,822	1,777	1,717	1,644	1,562	1,478	1,264	1,119
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,151	0,050	0,043	0,031	0,037	0,054	0,063	0,066	0,090	0,107	0,189
	min		1,587	1,782	1,770	1,792	1,736	1,637	1,577	1,463	1,399	1,056	0,838
	max		1,983	1,929	1,881	1,881	1,840	1,791	1,752	1,661	1,648	1,356	1,284
8370	mean	0,335	0,653	0,467	0,320	0,239	0,172	0,165	0,114	0,104	0,084	0,030	0,025
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	sd		0,408	0,443	0,328	0,378	0,315	0,284	0,227	0,207	0,169	0,060	0,050
	min		0,336	0,237	0,089	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		1,235	1,131	0,797	0,801	0,643	0,589	0,454	0,415	0,338	0,120	0,100
Total	mean	1,466	1,677	1,594	1,502	1,454	1,383	1,311	1,197	1,061	0,929	0,766	0,660
	N	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	sd		0,383	0,421	0,444	0,467	0,467	0,451	0,443	0,428	0,416	0,374	0,347
	min		0,336	0,237	0,089	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	max		1,983	1,929	1,881	1,881	1,840	1,791	1,752	1,661	1,648	1,356	1,284

11.26. Pruebas de regresión ApxIV en el grupo A

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	.006396562	1	.006396562	F(1, 38)	=	0.04
Residual	5.72383015	38	.150627109	Prob > F	=	0.8378
				R-squared	=	0.0011
				Adj R-squared	=	-0.0252
Total	5.73022671	39	.14692889	Root MSE	=	.38811

H	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]

```
. regress H SPMADRE
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	4.71309933	1	4.71309933	F(1, 38)	=	176.08
Residual	1.01712737	38	.02676651	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.8225
				Adj R-squared	=	0.8178
Total	5.73022671	39	.14692889	Root MSE	=	.1636

H	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
SPMADRE	.8877544	.0669014	13.27	0.000	.7523195 1.023189
_cons	.3757555	.1014315	3.70	0.001	.170418 .5810929

```
. regress VALORSP EDAD
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	44.6838798	1	44.6838798	F(1, 438)	=	250.43
Residual	78.1520501	438	.178429338	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.3638
				Adj R-squared	=	0.3623
Total	122.83593	439	.279808496	Root MSE	=	.42241

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
EDAD	-.1007741	.0063681	-15.82	0.000	-.1132899 -.0882584
_cons	1.734232	.0376739	46.03	0.000	1.660188 1.808276

```
. regress VALORSP EDAD SPMADRE
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	99.3774105	2	49.6887052	F(2, 437)	=	925.63
Residual	23.4585194	437	.053680822	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.8090
				Adj R-squared	=	0.8082
Total	122.83593	439	.279808496	Root MSE	=	.23169

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
EDAD	-.1007741	.0034929	-28.85	0.000	-.1076391 -.0939092
SPMADRE	.9118243	.0285662	31.92	0.000	.8556801 .9679686
_cons	.3974977	.0466988	8.51	0.000	.3057155 .4892799

11.27. Valor S/P OmpA por animal y edad en el grupo A

RESULTADOS OMPA LECHONES GRUPO A (VALOR S/P)													
ID. Lechón	CERDA	SEXO	24H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	7553	MACHO	1,380	1,096	0,857	0,596	0,489	0,379	0,252	0,162	0,173	0,237	0,237
2	7553	HEMBRA	1,165	0,748	0,443	0,272	0,278	0,249	0,171	0,106	0,205	0,220	0,250
3	7553	MACHO	0,151	0,150	0,330	0,224	0,209	0,198	0,187	0,234	0,232	0,274	0,159
4	7553	MACHO	1,417	1,000	0,516	0,504	0,302	0,300	0,135	0,071	0,093	0,083	0,117
5	7553	HEMBRA	0,767	0,391	0,259	0,199	0,162	0,161	0,124	0,099	0,322	0,306	0,261
6	7553	MACHO	1,057	0,694	0,455	0,379	0,265	0,191	0,154	0,104	0,072	0,071	0,065
7	6461	MACHO	1,082	0,417	0,332	0,301	0,210	0,152	0,122	0,093	0,077	0,066	0,062
8	6461	HEMBRA	0,806	0,542	0,388	0,302	0,289	0,246	0,197	0,287	0,291	0,179	0,137
9	6461	HEMBRA	1,163	0,809	0,418	0,298	0,201	0,175	0,112	0,078	0,077	0,079	0,105
10	6461	MACHO	0,958	0,684	0,529	0,367	0,281	0,195	0,144	0,146	0,172	0,209	0,291
11	6461	MACHO	1,093	0,666	0,462	0,399	0,263	0,238	0,191	0,120	0,110	0,105	0,106
12	6461	HEMBRA	0,871	0,427	0,220	0,220	0,169	0,144	0,065	0,046	0,036	0,046	0,048
13	7919	MACHO	1,855	1,582	1,067	0,887	0,760	0,626	0,467	0,297	0,238	0,265	0,226
14	7919	HEMBRA	1,666	1,560	1,270	0,979	0,956	0,740	0,418	0,326	0,195	0,149	0,105
15	7919	MACHO	1,857	1,346	1,055	0,698	0,548	0,445	0,357	0,237	0,145	0,098	0,089
16	7919	MACHO	1,689	1,367	0,975	0,948	0,727	0,522	0,363	0,240	0,167	0,119	0,119
17	7919	MACHO	1,866	1,507	1,165	1,105	0,845	0,748	0,557	0,335	0,206	0,140	0,116
18	7919	MACHO	1,781	1,398	1,275	0,892	0,695	0,469	0,271	0,237	0,263	0,191	0,254
19	6317	MACHO	1,758	0,971	0,589	0,473	0,304	0,277	0,164	0,140	0,106	0,099	0,117
20	6317	HEMBRA	2,003	1,411	0,844	0,553	0,410	0,312	0,163	0,187	0,123	0,082	0,119
21	6317	MACHO	2,025	1,508	0,965	0,688	0,595	0,369	0,373	0,230	0,170	0,126	0,178
22	6317	HEMBRA	1,908	1,733	1,060	0,883	0,503	0,353	0,196	0,140	0,082	0,098	0,083
23	6317	HEMBRA	1,565	1,439	0,883	0,745	0,445	0,336	0,187	0,119	0,073	0,066	0,049
24	6317	HEMBRA	1,792	1,538	1,235	0,912	0,773	0,594	0,277	0,178	0,156	0,119	0,121
25	7429	HEMBRA	1,221	0,900	0,608	0,413	0,399	0,379	0,280	0,279	0,354	0,291	0,309
26	7429	HEMBRA	0,710	0,524	0,323	0,328	0,289	0,192	0,197	0,148	0,129	0,167	0,164
27	7429	MACHO	1,157	0,924	0,500	0,350	0,288	0,255	0,112	0,147	0,110	0,125	0,178
28	7429	MACHO	1,244	0,807	0,425	0,377	0,368	0,295	0,248	0,189	0,167	0,126	0,101
29	7429	HEMBRA	1,199	0,830	0,627	0,503	0,389	0,336	0,186	0,166	0,110	0,255	0,194
30	7429	HEMBRA	1,220	0,863	0,719	0,535	0,351	0,305	0,186	0,098	0,170	0,150	0,183
31	8370	HEMBRA	1,027	1,028	0,760	0,718	0,422	0,302	0,234	0,238	0,215	0,173	0,211
32	8370	MACHO	0,888	0,764	0,497	0,455	0,387	0,242	0,179	0,126	0,120	0,103	0,099
34	8370	MACHO	0,810	0,702	0,429	0,374	0,352	0,228	0,161	0,097	0,109	0,087	0,118
36	8370	MACHO	0,452	0,312	0,153	0,160	0,113	0,144	0,109	0,074	0,066	0,094	0,091
37	6759	HEMBRA	0,535	0,301	0,173	0,136	0,101	0,078	0,037	0,081	0,175	0,206	0,203
38	6759	HEMBRA	0,616	0,458	0,279	0,126	0,109	0,091	0,044	0,034	0,058	0,070	0,072
39	6759	MACHO	0,597	0,568	0,557	0,478	0,411	0,298	0,240	0,241	0,183	0,165	0,420
40	6759	MACHO	0,500	0,451	0,203	0,142	0,097	0,087	0,044	0,098	0,165	0,171	0,210
41	6759	MACHO	0,353	0,183	0,148	0,093	0,080	0,051	0,046	0,048	0,084	0,097	0,113
42	6759	HEMBRA	0,727	0,691	0,361	0,217	0,177	0,168	0,140	0,170	0,238	0,104	0,113

11.28. Tabla de medias del valor S/P OmpA por edad, con intervalo de confianza al 95% en el grupo A

Edad	Media	Std. Err.	IC95% (Media valor S/P)	
			inf	sup
24H	1,173	0,080	1,011	1,336
S1	0,882	0,070	0,741	1,023
S2	0,609	0,053	0,501	0,716
S3	0,481	0,043	0,393	0,568
S4	0,375	0,035	0,305	0,445
S5	0,297	0,027	0,243	0,350
S6	0,202	0,018	0,165	0,239
S7	0,161	0,013	0,135	0,187
S8	0,156	0,012	0,132	0,180
S9	0,145	0,011	0,123	0,167
S10	0,155	0,013	0,129	0,181

11.29. Tabla de valores S/P OmpA por semana agrupados por sexo en el grupo A

SEXO	stats	H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
HEMBRA	mean	1,165	0,900	0,604	0,463	0,357	0,287	0,179	0,154	0,167	0,153	0,152
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	sd	0,457	0,453	0,345	0,279	0,223	0,167	0,091	0,084	0,092	0,078	0,075
	min	0,535	0,301	0,173	0,126	0,101	0,078	0,037	0,034	0,036	0,046	0,048
	max	2,003	1,733	1,270	0,979	0,956	0,740	0,418	0,326	0,354	0,306	0,309
MACHO	mean	1,180	0,868	0,613	0,495	0,390	0,305	0,222	0,167	0,147	0,139	0,158
	N	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
	sd	0,558	0,441	0,336	0,274	0,221	0,172	0,132	0,079	0,057	0,061	0,086
	min	0,151	0,150	0,148	0,093	0,080	0,051	0,044	0,048	0,066	0,066	0,062
	max	2,025	1,582	1,275	1,105	0,845	0,748	0,557	0,335	0,263	0,274	0,420
Total	mean	1,173	0,882	0,609	0,481	0,375	0,297	0,202	0,161	0,156	0,145	0,155
	N	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	sd	0,509	0,441	0,336	0,273	0,219	0,168	0,116	0,080	0,074	0,069	0,081
	min	0,151	0,150	0,148	0,093	0,080	0,051	0,037	0,034	0,036	0,046	0,048
	max	2,025	1,733	1,275	1,105	0,956	0,748	0,557	0,335	0,354	0,306	0,420

11.30. Tabla de valores S/P OmpA a las 24 horas de vida agrupados por camada en el grupo

A

CERDA	N	Paridad	Media	Mediana	IQR	Min	Max
6317	6	6	1,842	1,850	0,245	1,565	2,025
6461	6	5	0,996	1,020	0,222	0,806	1,163
6759	6	4	0,555	0,566	0,116	0,353	0,727
7429	6	3	1,125	1,210	0,064	0,710	1,244
7553	6	3	0,990	1,111	0,613	0,151	1,417
7919	6	2	1,786	1,818	0,168	1,666	1,866
8370	4	1	0,794	0,849	0,327	0,452	1,027

11.31. Tabla de valores S/P OmpA por semana agrupados por cerda en el grupo A

CERDA	stats	S/P MADRE	H	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
6317	mean	1,391	1,842	1,433	0,929	0,709	0,505	0,374	0,227	0,166	0,118	0,098	0,111
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,173	0,253	0,218	0,175	0,163	0,113	0,083	0,041	0,039	0,022	0,043
	min		1,565	0,971	0,589	0,473	0,304	0,277	0,163	0,119	0,073	0,066	0,049
	max		2,025	1,733	1,235	0,912	0,773	0,594	0,373	0,230	0,170	0,126	0,178
6461	mean	1,088	0,996	0,591	0,392	0,315	0,236	0,192	0,139	0,128	0,127	0,114	0,125
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,140	0,156	0,107	0,062	0,049	0,043	0,050	0,085	0,092	0,066	0,088
	min		0,806	0,417	0,220	0,220	0,169	0,144	0,065	0,046	0,036	0,046	0,048
	max		1,163	0,809	0,529	0,399	0,289	0,246	0,197	0,287	0,291	0,209	0,291
6759	mean	0,604	0,555	0,442	0,287	0,199	0,163	0,129	0,092	0,112	0,151	0,136	0,189
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,126	0,182	0,154	0,143	0,126	0,092	0,082	0,079	0,067	0,053	0,126
	min		0,353	0,183	0,148	0,093	0,080	0,051	0,037	0,034	0,058	0,070	0,072
	max		0,727	0,691	0,557	0,478	0,411	0,298	0,240	0,241	0,238	0,206	0,420
7429	mean	1,229	1,125	0,808	0,534	0,418	0,347	0,294	0,202	0,171	0,173	0,186	0,188
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,205	0,146	0,146	0,084	0,049	0,065	0,058	0,061	0,092	0,070	0,068
	min		0,710	0,524	0,323	0,328	0,288	0,192	0,112	0,098	0,110	0,125	0,101
	max		1,244	0,924	0,719	0,535	0,399	0,379	0,280	0,279	0,354	0,291	0,309
7553	mean	1,221	0,990	0,680	0,477	0,362	0,284	0,246	0,171	0,129	0,183	0,199	0,182
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,474	0,359	0,208	0,161	0,112	0,081	0,046	0,059	0,092	0,099	0,080
	min		0,151	0,150	0,259	0,199	0,162	0,161	0,124	0,071	0,072	0,071	0,065
	max		1,417	1,096	0,857	0,596	0,489	0,379	0,252	0,234	0,322	0,306	0,261
7919	mean	1,421	1,786	1,460	1,135	0,918	0,755	0,592	0,406	0,279	0,202	0,160	0,152
	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	sd		0,089	0,103	0,123	0,134	0,138	0,133	0,099	0,046	0,044	0,060	0,070
	min		1,666	1,346	0,975	0,698	0,548	0,445	0,271	0,237	0,145	0,098	0,089
	max		1,866	1,582	1,275	1,105	0,956	0,748	0,557	0,335	0,263	0,265	0,254
8370	mean	1,196	0,794	0,702	0,460	0,427	0,319	0,229	0,171	0,134	0,128	0,114	0,130
	N	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	sd		0,245	0,296	0,249	0,231	0,140	0,065	0,052	0,073	0,063	0,040	0,055
	min		0,452	0,312	0,153	0,160	0,113	0,144	0,109	0,074	0,066	0,087	0,091
	max		1,027	1,028	0,760	0,718	0,422	0,302	0,234	0,238	0,215	0,173	0,211
Total	mean	1,163	1,173	0,882	0,609	0,481	0,375	0,297	0,202	0,161	0,156	0,145	0,155
	N	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	sd	0,262	0,509	0,441	0,336	0,273	0,219	0,168	0,116	0,080	0,074	0,069	0,081
	min	0,604	0,151	0,150	0,148	0,093	0,080	0,051	0,037	0,034	0,036	0,046	0,048
	max	1,421	2,025	1,733	1,275	1,105	0,956	0,748	0,557	0,335	0,354	0,306	0,420

11.32. Pruebas de regresión OmpA en el grupo A

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	.00252002	1	.00252002	F(1, 38)	=	0.01
Residual	10.088198	38	.265478894	Prob > F	=	0.9229
				R-squared	=	0.0002
				Adj R-squared	=	-0.0261
Total	10.090718	39	.258736358	Root MSE	=	.51525

H	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
SEXO	-.0159545	.1637561	-0.10	0.923	-.3474614 .3155523
_cons	1.196409	.2510333	4.77	0.000	.6882187 1.704599

```
. regress H SPMADRE
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	40
Model	5.64972618	1	5.64972618	F(1, 38)	=	48.34
Residual	4.44099179	38	.116868205	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.5599
				Adj R-squared	=	0.5483
Total	10.090718	39	.258736358	Root MSE	=	.34186

H	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
SPMADRE	1.454486	.2091915	6.95	0.000	1.031 1.877972
_cons	-.517856	.2491607	-2.08	0.044	-1.022255 -.0134565

```
. regress VALORSP EDAD
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	37.9152996	1	37.9152996	F(1, 438)	=	434.98
Residual	38.1783324	438	.087165143	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.4983
				Adj R-squared	=	0.4971
Total	76.093632	439	.173334014	Root MSE	=	.29524

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
EDAD	-.0928284	.0044509	-20.86	0.000	-.1015761 -.0840807
_cons	.8856489	.0263317	33.63	0.000	.8338967 .9374011

```
. regress VALORSP EDAD SPMADRE
```

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	440
Model	45.5418789	2	22.7709394	F(2, 437)	=	325.71
Residual	30.5517531	437	.069912479	Prob > F	=	0.0000
				R-squared	=	0.5985
				Adj R-squared	=	0.5967
Total	76.093632	439	.173334014	Root MSE	=	.26441

VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
EDAD	-.0928284	.0039861	-23.29	0.000	-.1006628 -.084994
SPMADRE	.5095237	.0487839	10.44	0.000	.4136434 .6054041
_cons	.2932256	.061428	4.77	0.000	.1724945 .4139567

Final multivariable fractional polynomial model for VALORSP						
Variable	Initial			Final		
	df	Select	Alpha	Status	df	Powers
SPMADRE	4	1.0000	0.0500	in	4	3 3
EDAD	4	1.0000	0.0500	in	4	1 1
Source	SS	df	MS	Number of obs = 440		
Model	58.0222188	4	14.5055547	F(4, 435) = 349.17		
Residual	18.0714131	435	.041543478	Prob > F = 0.0000		
Total	76.093632	439	.173334014	R-squared = 0.7625		
				Adj R-squared = 0.7603		
				Root MSE = .20382		
VALORSP	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
ISPMA__1	-.0817574	.0446289	-1.83	0.068	-.1694724	.0059577
ISPMA__2	.5978367	.0989237	6.04	0.000	.4034089	.7922645
IEDAD__1	-1.546536	.0526756	-29.36	0.000	-1.650066	-1.443005
IEDAD__2	1.605827	.1111282	14.45	0.000	1.387412	1.824242
_cons	.1763998	.0173229	10.18	0.000	.1423527	.2104469
Deviance: -156.009.						

11.33. Tabla de valores S/P ApXI, ApXII, ApXIII, ApXIV y OmpA por animal a las 18 semanas de vida en el grupo A

Id lechón	Valor S/P ApXI	Valor S/P ApXII	Valor S/P ApXIII	Valor S/P ApXIV	Valor S/P OmpA
1	0,000	0,592	0,091	0,236	0,311
4	0,000	0,040	0,000	0,100	0,305
5	0,000	0,000	0,089	0,112	0,155
6	0,000	0,000	0,014	0,000	0,212
7	0,000	0,000	0,012	0,211	0,132
8	0,000	0,455	0,044	0,158	0,594
9	0,000	0,154	0,057	0,074	0,163
10	0,000	0,000	0,027	0,048	0,149
11	0,000	0,013	0,000	0,050	0,820
12	0,000	0,050	0,025	0,000	0,136
14	0,000	0,000	0,000	0,444	0,098
15	0,000	0,000	0,045	0,412	0,276
16	0,000	0,022	0,000	0,420	0,125
17	0,000	0,002	0,000	0,376	0,167
18	0,000	0,030	0,000	0,230	0,224
19	0,029	0,023	0,041	0,106	0,063
20	0,000	0,025	0,000	0,086	0,231
21	0,025	0,080	0,022	0,087	0,141
22	0,000	0,049	0,000	0,071	0,173
23	0,000	0,042	0,000	0,000	0,187
24	0,000	0,000	0,079	0,114	0,060
25	0,000	0,233	0,021	0,000	0,030
26	0,000	0,005	0,031	0,099	0,162
27	0,000	0,030	0,114	0,103	0,547
28	0,025	0,393	0,207	0,045	0,172
29	0,000	0,100	0,086	0,225	0,203
30	0,000	0,168	0,019	0,172	0,415
31	0,000	0,241	0,023	0,000	0,205
32	0,000	0,041	0,026	0,000	0,286
34	0,000	0,300	0,253	0,000	0,129
36	0,000	0,000	0,000	0,000	0,148
37	0,000	0,119	0,000	0,085	0,150
38	0,000	0,237	0,020	0,098	0,304
39	0,000	0,000	0,000	0,000	0,556
40	0,000	0,000	0,051	0,092	0,177
41	0,000	0,081	0,000	0,015	0,187
42	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167

11.34. Tabla de medias del valor S/P obtenidos con las pruebas ELISA frente a la toxina ApxI, II, III, IV y la proteína OmpA con intervalo de confianza al 95% a las 18 semanas de vida en el grupo A

	Mean	Std. Err.	IC95% (Media valor S/P)	
			inf	sup
ApxI	0,002	0,001	0,000	0,005
ApxII	0,095	0,024	0,048	0,143
ApxIII	0,038	0,009	0,019	0,057
ApxIV	0,115	0,021	0,073	0,157
OmpA	0,231	0,027	0,177	0,286

11.35. Tabla de valores S/P Apxl, ApxII, ApxIII, ApxIV y OmpA por animal y edad en el grupo B

RESULTADOS LECHONES GRUPO B (VALOR S/P)										
Id lechón	Valor S/P Apxl		Valor S/P ApxII		Valor S/P ApxIII		Valor S/P ApxIV		Valor S/P OmpA	
	S4	S10	S4	S10	S4	S10	S4	S10	S4	S10
1	0,000	0,000	0,075	0,179	0,045	0,082	0,000	0,000	0,174	0,188
3	0,000	0,000	0,073	0,044	0,000	0,018	0,000	0,000	0,287	0,177
4	0,000	0,000	0,453	0,133	0,023	0,152	0,000	0,000	0,273	0,276
5	0,000	0,108	0,171	0,613	0,072	0,467	0,000	0,000	0,086	0,076
6	0,000	0,000	0,160	0,324	0,000	0,045	0,011	0,000	0,120	0,152
7	0,000	0,000	0,355	0,734	0,000	0,005	0,000	0,000	0,129	0,271
9	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,093	0,122
10	0,000	0,000	0,673	0,712	0,000	0,018	0,000	0,000	0,035	0,087
12	0,000	0,000	0,396	0,611	0,000	0,000	0,004	0,000	0,113	0,133
13	0,000	0,000	0,100	1,508	0,000	0,000	0,000	0,000	0,146	0,143
14	0,000	0,000	0,716	0,717	0,011	0,005	0,000	0,022	0,345	0,392
15	0,000	0,000	0,300	1,936	0,000	0,076	0,000	0,000	0,100	0,122
16	0,000	0,000	0,337	0,560	0,000	0,086	0,000	0,000	0,124	0,173
17	0,000	0,000	0,446	1,940	0,000	0,022	0,000	0,000	0,105	0,097
18	0,000	0,000	0,711	1,650	0,012	0,106	0,000	0,000	0,163	0,086
19	0,000	0,000	0,712	2,223	0,000	0,050	0,000	0,000	0,074	0,058
20	0,000	0,000	0,363	0,258	0,000	0,081	0,000	0,000	0,058	0,133
21	0,000	0,000	0,296	0,362	0,000	0,000	0,000	0,000	0,086	0,140
22	0,000	0,000	0,015	0,212	0,000	0,000	0,000	0,000	0,104	0,116
23	0,000	0,000	0,040	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,105	0,063
24	0,000	0,000	0,035	0,082	0,000	0,000	0,000	0,175	0,057	0,110
25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,272	0,132
26	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,259	0,210
27	0,000	0,000	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,053	0,043
28	0,000	0,000	0,000	1,326	0,000	0,020	0,000	0,000	0,126	0,135
29	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,212	0,167
30	0,000	0,000	0,339	0,085	0,000	0,000	0,000	0,000	0,105	0,113
31	0,000	0,000	0,168	0,111	0,000	0,068	0,000	0,000	0,300	0,258
32	0,000	0,000	0,400	0,578	0,000	0,003	0,000	0,000	0,079	0,081
33	0,000	0,015	1,824	3,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,093	0,182
34	0,000	0,000	0,290	0,691	0,000	0,000	0,000	0,150	0,223	0,245
35	0,000	0,029	0,974	0,332	0,000	0,000	0,000	0,000	0,253	0,259
36	0,000	0,000	0,615	0,217	0,005	0,000	0,077	0,000	0,149	0,138
37	0,000	0,000	0,714	0,286	0,000	0,000	0,000	0,000	0,258	0,222
38	0,000	0,061	0,381	0,182	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,069
39	0,000	0,000	0,506	0,271	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,059
40	0,000	0,000	3,210	0,258	0,000	0,000	0,000	0,000	0,064	0,113
41	0,000	0,041	0,307	0,495	0,000	0,048	0,000	0,118	0,090	0,050
42	0,000	0,164	0,019	0,579	0,081	0,127	0,000	0,000	0,129	0,126

11.36. Tabla de medias del valor S/P ApxI, II, III, IV y OmpA por edad, con intervalo de confianza al 95% en el grupo B

TOXINA	Edad	Mean	Std. Err.	IC95% (Media valor S/P)	
				inf	sup
ApxI	S4	0,000	0,000	0,000	0,000
ApxI	S10	0,011	0,005	0,000	0,021
ApxII	S4	0,416	0,093	0,229	0,604
ApxII	S10	0,596	0,114	0,365	0,827
ApxIII	S4	0,007	0,003	0,001	0,013
ApxIII	S10	0,038	0,013	0,011	0,064
ApxIV	S4	0,002	0,002	0,000	0,006
ApxIV	S10	0,011	0,006	0,000	0,025
OmpA	S4	0,142	0,013	0,115	0,169
OmpA	S10	0,147	0,012	0,122	0,171

11.37. Estudio de la concordancia entre las pruebas ELISA frente a la toxina ApxI y la ApxII

. cohenkap ApxI ApxII				
KAPPA & WEIGHTED KAPPA				
ApxI	ApxII		Total	
	Negativo	Positivo		
Negativo	72	43	115	
Positivo	0	0	0	
Total	72	43	115	
kappa	Standard Error		One-sided	95% Asymptotic
	SE0	SE1	p value	Confidence Interval
0.0000 to .*
		Estimate	95% Confidence Interval	
Specific Agreement (+)		0%	0% to 8.20% (Wilson)	
Specific Agreement (-)		77.0%	70.5% to 82.5% (Wilson)	
Global Agreement (+)		62.6%	53.5% to 70.9% (Wilson)	
kappa minimum		-0.2299		
kappa maximum		0.3439		
Observed Disagreement		Bias	Bias adjusted kappa	
X-Y+	X+Y-	Index	BAK	
0%	37.4%	-37.4%	-0.2299	
Observed Agreement		Prevalence	Prev. & Bias adjusted kappa	
(+)	(-)	Index	PABAK	
18.7%	81.3%	-62.6%	0.2522	
(*)Out of range				

11.38. Estudio de la concordancia entre las pruebas ELISA frente a la toxina ApxI y la ApxIII

. cohenkap ApxI ApxIII KAPPA & WEIGHTED KAPPA				
ApxI	ApxIII		Total	
	Negativo	Positivo		
Negativo	114	1	115	
Positivo	0	0	0	
Total	114	1	115	
kappa	Standard Error SE0	Error SE1	One-sided p value	95% Asymptotic Confidence Interval
0.0000	0.0000	0.0000	0.5000	-0.0000 to 0.0000
		Estimate	95% Confidence Interval	
Specific Agreement (+)		0%	0% to 79.3% (Wilson)	
Specific Agreement (-)		99.6%	97.6% to 99.9% (Wilson)	
Global Agreement (+)		99.1%	95.2% to 99.8% (Wilson)	
kappa minimum		-0.0044		
kappa maximum		0.9826		
Observed Disagreement X-Y+ X+Y-		Bias Index	Bias adjusted kappa BAK	
0% .87%		-.87%	-0.0044	
Observed Agreement (+) (-)		Prevalence Index	Prev. & Bias adjusted kappa PABAK	
.435% 99.6%		-99.1%	0.9826	

11.39. Estudio de la concordancia entre las pruebas ELISA frente a la toxina ApxII y la ApxIII

. cohenkap ApxII ApxIII				
KAPPA & WEIGHTED KAPPA				
ApxII	ApxIII		Total	
	Negativo	Positivo		
Negativo	72	0	72	
Positivo	42	1	43	
Total	114	1	115	
kappa	Standard Error		One-sided	95% Asymptotic
	SE0	SE1	p value	Confidence Interval
0.0290	0.0223	0.0285	0.0969	-0.0269 to 0.0848
		Estimate	95% Confidence Interval	
Specific Agreement (+)		4.55%	1.26% to 15.1% (Wilson)	
Specific Agreement (-)		77.4%	70.9% to 82.8% (Wilson)	
Global Agreement (+)		63.5%	54.4% to 71.7% (Wilson)	
kappa minimum		-0.2234		
kappa maximum		0.3555		
Observed Disagreement		Bias	Bias adjusted kappa	
X-Y+	X+Y-	Index	BAK	
36.5%	0%	36.5%	-0.1804	
Observed Agreement		Prevalence	Prev. & Bias adjusted kappa	
(+)	(-)	Index	PABAK	
19.1%	80.9%	-61.7%	0.2696	

11.40. Estudio de la concordancia entre las pruebas ELISA frente a la toxina ApxII y la ApxIV

. cohenkap ApxII ApxIV KAPPA & WEIGHTED KAPPA				
ApxII	ApxIV		Total	
	Negativo	Positivo		
Negativo	72	0	72	
Positivo	43	0	43	
Total	115	0	115	
kappa	Standard Error		One-sided	95% Asymptotic
0.0000	SE0	SE1	p value	Confidence Interval
 to .*
		Estimate	95% Confidence Interval	
Specific Agreement (+)		0%	0% to 8.20% (Wilson)	
Specific Agreement (-)		77.0%	70.5% to 82.5% (Wilson)	
Global Agreement (+)		62.6%	53.5% to 70.9% (Wilson)	
kappa minimum		-0.2299		
kappa maximum		0.3439		
Observed Disagreement		Bias Index	Bias adjusted kappa	
X-Y+	X+Y-		BAK	
37.4%	0%	37.4%	-0.2299	
Observed Agreement		Prevalence Index	Prev. & Bias adjusted kappa	
(+)	(-)		PABAK	
18.7%	81.3%	-62.6%	0.2522	
(*)Out of range				

11.41. Estudio de la concordancia entre las pruebas ELISA frente a la toxina ApxII y la proteína OmpA

. cohenkap ApxII OMPA KAPPA & WEIGHTED KAPPA				
ApxII	OMPA		Total	
	Negativo	Positivo		
Negativo	69	3	72	
Positivo	42	1	43	
Total	111	4	115	
kappa	Standard Error		One-sided	95% Asymptotic
	SE0	SE1	p value	Confidence Interval
-0.0225	0.0432	0.0402	0.3011	-0.1013 to 0.0563
		Estimate	95% Confidence Interval	
Specific Agreement (+)		4.26%	1.17% to 14.2% (Wilson)	
Specific Agreement (-)		75.4%	68.7% to 81.1% (Wilson)	
Global Agreement (+)		60.9%	51.7% to 69.3% (Wilson)	
kappa minimum		-0.2432		
kappa maximum		0.3213		
Observed Disagreement		Bias	Bias adjusted kappa	
X-Y+	X+Y-	Index	BAK	
36.5%	2.61%	33.9%	-0.2033	
Observed Agreement		Prevalence	Prev. & Bias adjusted kappa	
(+)	(-)	Index	PABAK	
20.4%	79.6%	-59.1%	0.2174	

11.42. Estudio de la concordancia entre las pruebas ELISA frente a la toxina ApxIII y la proteína OmpA

. cohenkap ApxIII OMPA KAPPA & WEIGHTED KAPPA				
ApxIII	OMPA		Total	
	Negativo	Positivo		
Negativo	110	4	114	
Positivo	1	0	1	
Total	111	4	115	
kappa	Standard Error		One-sided	95% Asymptotic
	SE0	SE1	p value	Confidence Interval
-0.0141	0.0740	0.0115	0.4244	-0.0366 to 0.0083
		Estimate	95% Confidence Interval	
Specific Agreement (+)		0%	0% to 43.4% (Wilson)	
Specific Agreement (-)		97.8%	94.9% to 99.0% (Wilson)	
Global Agreement (+)		95.7%	90.2% to 98.1% (Wilson)	
kappa minimum		-0.0222		
kappa maximum		0.9132		
Observed Disagreement		Bias	Bias adjusted kappa	
X-Y+	X+Y-	Index	BAK	
.87%	3.48%	-2.61%	-0.0222	
Observed Agreement		Prevalence	Prev. & Bias adjusted kappa	
(+)	(-)	Index	PABAK	
2.17%	97.8%	-95.7%	0.9130	

11.43. Estudio de la concordancia entre las pruebas ELISA frente a la toxina ApxIII y la ApxIV

. cohenkap ApxIII ApxIV KAPPA & WEIGHTED KAPPA				
ApxIII	ApxIV		Total	
	Negativo	Positivo		
Negativo	114	0	114	
Positivo	1	0	1	
Total	115	0	115	
kappa	Standard Error		One-sided p value	95% Asymptotic Confidence Interval
0.0000	SE0	SE1	0.5000	-0.0000 to 0.0000
		Estimate	95% Confidence Interval	
Specific Agreement (+)		0%	0% to 79.3% (Wilson)	
Specific Agreement (-)		99.6%	97.6% to 99.9% (Wilson)	
Global Agreement (+)		99.1%	95.2% to 99.8% (Wilson)	
kappa minimum		-0.0044		
kappa maximum		0.9826		
Observed Disagreement		Bias Index	Bias adjusted kappa	
X-Y+	X+Y-		BAK	
.87%	0%	.87%	-0.0044	
Observed Agreement		Prevalence Index	Prev. & Bias adjusted kappa	
(+)	(-)		PABAK	
.435%	99.6%	-99.1%	0.9826	

11.44. Estudio de la concordancia entre las pruebas ELISA frente a la proteína OmpA y la toxina ApxIV

. cohenkap ApxIV OMPA KAPPA & WEIGHTED KAPPA				
ApxIV	OMPA		Total	
	Negativo	Positivo		
Negativo	111	4	115	
Positivo	0	0	0	
Total	111	4	115	
kappa	Standard Error SE0	Error SE1	One-sided p value	95% Asymptotic Confidence Interval
0.0000	0.0000	0.0000	.	0.0000 to 0.0000
		Estimate	95% Confidence Interval	
Specific Agreement (+)		0%	0% to 49.0% (Wilson)	
Specific Agreement (-)		98.2%	95.5% to 99.3% (Wilson)	
Global Agreement (+)		96.5%	91.4% to 98.6% (Wilson)	
kappa minimum		-0.0177		
kappa maximum		0.9305		
Observed Disagreement		Bias Index	Bias adjusted kappa BAK	
X-Y+	X+Y-			
0%	3.48%	-3.48%	-0.0177	
Observed Agreement		Prevalence Index	Prev. & Bias adjusted kappa PABAK	
(+)	(-)			
1.74%	98.3%	-96.5%	0.9304	

11.45. Estudio de la concordancia entre las pruebas ELISA frente a la proteína OmpA y la toxina ApxI

. cohenkap OMPA ApxI KAPPA & WEIGHTED KAPPA				
OMPA	ApxI		Total	
	Negativo	Positivo		
Negativo	111	0	111	
Positivo	4	0	4	
Total	115	0	115	
kappa	Standard Error		One-sided	95% Asymptotic
0.0000	SE0	SE1	p value	Confidence Interval
	0.0000	0.0000	.	0.0000 to 0.0000
		Estimate	95% Confidence Interval	
Specific Agreement (+)		0%	0% to 49.0% (Wilson)	
Specific Agreement (-)		98.2%	95.5% to 99.3% (Wilson)	
Global Agreement (+)		96.5%	91.4% to 98.6% (Wilson)	
kappa minimum		-0.0177		
kappa maximum		0.9305		
Observed Disagreement		Bias	Bias adjusted kappa	
X-Y+	X+Y-	Index	BAK	
3.48%	0%	3.48%	-0.0177	
Observed Agreement		Prevalence	Prev. & Bias adjusted kappa	
(+)	(-)	Index	PABAK	
1.74%	98.3%	-96.5%	0.9304	

