

75

20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

SEROTIPIFICACION DE Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae, AISLADOS A PARTIR DE PULMONES CON PLEUROPNEUMONIA CONTAGIOSA OBTENIDOS EN EL RASTRO DE FERRERIA, D. F.

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA P R E S E N T A : GONZALO MEDINA ARREOLA

DIRECTOR DE TESIS M.V.Z., M. en C. Abel Ciprián Carrasco.

ASESOR DE TESIS: M. en C. José Camacho Machín



Cuautitlán Izcalli, Estado de México 1986.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

	pag.
INDICE	1
RESUMEN	2
INTRODUCCION	3
1).- Aspectos económicos de la enfermedad	3
2).- Etiología	3
3).- Epizootiología	5
4).- Diagnóstico clínico	7
5).- Hallazgos macroscópicos	9
6).- Inmunidad	11
7).- Estudios de serotipificación	14
7.1).- Distribución geográfica de los serotipos- de <u>H. pleuropneumoniae</u>	18
8).- Tratamiento	19
9).- Control y profilaxis	20
10).- Estudios realizados en México	22
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y METODOS	25
Material	25
Metodología	27
RESULTADOS	30
DISCUSION	33
CONCLUSIONES	35
RECOMENDACIONES	36
BIBLIOGRAFIA	37

RESUMEN.

La pleuroneumonía contagiosa porcina se asocia a Haemophilus pleuropneumoniae y usualmente es considerado como un agente primario que no requiere de una primoinfección para establecerse, se le han encontrado 9 serotipos capsulares distintos y en casos de una infección y recuperación hay inmunidad cruzada, pero en casos de vacunación esto no sucede. De ahí el conocer los serotipos predominantes de cada país. En México solamente se ha aislado el H. pleuropneumoniae a partir de un brote en el estado de Tlaxcala, pero no hay reportes sobre la serotipificación. Por tal motivo se realizó en el rancho de Ferreria del D.F., una inspección durante 8 meses, en donde se observaron 41,060 cerdos de abasto. Se observó que 11,572 (28.2 %) presentaron lesiones neumónicas. De las lesiones neumónicas un 2.73 % (316) se caracterizaron como lesiones de tipo pleuroneumónico (1.85 % agudo y 0.88 % crónico). Se seleccionó y un 20 % de estos pulmones (42 agudos y 21 crónicos) se sembraron en agar sangre con cepa nodulosa de Staphylococcus aureus, a los aislamientos sospechosos se les realizaron pruebas bioquímicas para identificarlos (factor V, Ureasa, Indol, MR-VP, CAMP, etc.). La serotipificación se realizó en el Dpto. de grandes especies de la Universidad de Minnesota, E.U.A., y corroborado en el Instituto de Medicina Veterinaria del estado de Iowa por el Dr. Ross. La técnica que se empleó fué la aglutinación en placa, para lo que se realizó una suspensión de la bacteria en solución salina formalizada al 0.1 % y se enfrentó a los serotipos correspondientes del 1 al 7 de Haemophilus pleuropneumoniae. Todos los Haemophilus aislados se identificaron como Haemophilus pleuropneumoniae SEROTIPO 1.

## INTRODUCCION.

### 1).- ASPECTOS ECONOMICOS DE LA ENFERMEDAD.

La pleuroneumonía contagiosa porcina causada por el Haemophilus pleuropneumoniae, representa en la porcicultura uno de los los más graves problemas a los cuales se enfrenta la ganadería porcina, ya que tener esta enfermedad representa para la industria porcícola un enorme costo debido a la mortalidad que llega a ser hasta de un 40 %, a las deficientes ganancias de peso y el retraso en el crecimiento que sufren los cerdos, como lo es el caso de estudios realizados en Japón, Canadá, E.U.A. y México entre otros (Pijoan y col. 1978; Osborne y col. 1981; Rosendal y Mitchell, 1983; Sebunya y Saunders, 1983).

Esta importancia económica de la pleuroneumonía contagiosa se hace más evidente en la práctica de crianza intensiva con sistemas de confinamiento total. Ya que el hacinamiento de los animales hacen que esten más propensos a adquirir esta enfermedad (Ramírez, 1980).

### 2).- ETIOLOGIA.

Esta enfermedad es producida por el Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae; a diferencia de otras bacterias el Haemophilus es un agente primario, que usualmente no necesita de primo-infección para establecerse (Saunders y col. 1981; Sebunya, 1983).

Las principales características de esta bacteria son: Gram-negativa, no móvil, no forma esporas, es pleomórficamente redonda, capsulados y con crecimiento óptimo entre 24 y 96 horas de incubación, formando pequeñas colonias opacas de aproximadamente de 1 a 2 mm., de diámetro; requiere del factor V (Nicotin Adenin Dinucleótido) para su crecimiento, es anaerobio facultativo, reacciona a sustancias bioquímicas, fermenta a los productos de la glucosa, usualmente crece bien en el agar sangre y en agar PPLO con Staphylococcus aureus como cepa nodriza. Existen actualmente 9 serotipos, los cuales todos son capsulados (Kilian y col. 1978; Pijean y col. 1978; Gunnarsson, 1979; Sabunya y Saunders, 1983).

En años recientes, estudios sobre la genética de esta bacteria, por medio del uso de la homología del DNA, se demostró que la bacteria tiene una gran similitud con la Pasteurella haemolytica que produce lesiones similares en el pulmón, con la diferencia que el Haemophilus presenta una dependencia hacia el FAD (factor V), siendo en el resto de las pruebas fenotípicamente idénticas. De esta manera el Haemophilus se comporta muy parecido a la P. haemolytica tanto en su patogenia como en su comportamiento bioquímico, por lo que se ha propuesto que estos microorganismos estén fuera de lugar en sus respectivos géneros y que deben de transferirse al género Actinobacillus al que se asemejan mucho. Existe una diferencia entre ellos y es que el Haemophilus es un patógeno primario, mientras que la Pasteurella es un patógeno secundario, es por esto que se ha propuesto

el cambio de nombre de H. pleuropneumoniae a Actinobacillus pleuropneumoniae. Este cambio ha tenido problemas, porque la alteración del nombre es considerada importante en el proceso de la descripción de la etiología y la epidemiología de la bacteria, puesto que entonces se partiría del grupo de los Actinobacillus. Para facilitar la práctica y el orden de comunicación entre la investigación y el campo, ha sido conveniente el uso temporal de la denominación de Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae (Pijoan, 1984; Nicolet, 1985).

### 3).- EPIZOOTIOLOGIA.

La pleuroneumonía contagiosa porcina se presenta en una granja, cuando se introducen cerdos aparentemente sanos (portadores sanos), los cuales dentro de la granja difunden rápidamente la enfermedad en el hato, siendo de esta manera la forma más común de transmitir la pleuroneumonía contagiosa porcina de un lugar a otro (Sanford y Josephson, 1981; Sebuya y col. 1982; Nicolet, 1985).

El H. pleuropneumoniae es la única bacteria que puede por sí sola causar una neumonía severa, esto es posible si la bacteria no es inactivada con anterioridad por la deshidratación del medio ambiente, por el moco traqueo-bronquial; cuando logra pasar estas barreras de defensa del organismo, llega hasta el alveolo pulmonar donde es atacado por los macrófagos alveolares, pero el Haemophilus los destruye por medio de una toxina que libera, instalándose en el alveolo y produciendo la enfermedad.

Los animales no desarrollan la neumonía en forma directa al inspirar el aerosol infectado, esto es cuando los cerdos esten clínicamente sanos, pero pueden presentar la enfermedad cuando:

- a).- Se utilizan corrales o jaulas que permiten el contacto excesivo entre un cerdo y otro.
- b).- Y cuando se mezclan constantemente animales de diferentes grupos y edades.

Esta transmisión se intensifica cuando hay un estrés como el destete, que al mezclar cerdos de diferentes edades y camadas en una sola corraleta ocasiona peleas, esto aunado con la densidad de población, la falta de ventilación, el concomitante aumento del amoniaco y la humedad relativa del ambiente, hacen que la aparición de la enfermedad sea más dramática (Pijoan, 1984).

Otro factor que predispone a la aparición de la pleuroneumonía contagiosa son: la época del año, como los meses de verano de abril a junio, porque hay mayor humedad debido a las lluvias y los meses de invierno de octubre a enero, donde el frío afecta mucho el tracto respiratorio del cerdo (Osborne y col. 1981; Sanford y Josephson, 1981; Sebunya y col. 1982; Mason y col. 1982).

La epizootiología de esta enfermedad está también usualmente asociada con la producción intensiva, porque hay un mayor contacto entre un cerdo y otro por la densidad de población, donde en este tipo de sistemas de explotación es mayor, por lo que la manifestación de la enfermedad es explosiva (Ramírez, 1980; Sebunya y Saunders, 1983).



El periodo de incubación es de 6 horas experimentalmente y a nivel de campo varia este periodo, ya que depende de la susceptibilidad de la granja y del número de microorganismos que entran hasta el pulmón; a las 24 horas aparecen los primeros signos clínicos evidentes, así como las primeras muertes (Ramírez, 1980).

La pleuroneumonía contagiosa ataca inicialmente a los cerdos adultos, los cuales lo transmiten a los cerdos de destete y a los de engorda en donde se establece esta enfermedad (Sanford y Josephson, 1981).

No solo el cerdo puede transmitir la pleuroneumonía contagiosa, sino otros animales transmisores, como la fauna silvestre principalmente aves y roedores que es común en las granjas (Ramírez, 1980; Nicolet, 1985).

#### 4).- DIAGNOSTICO CLINICO.

La pleuroneumonía contagiosa tiene un comportamiento complejo al infectar una granja, ya que se necesita de un portador sano que es lo más común y frecuente, este portador al introducirlo al hato por contacto directo contagia a los demás animales, siendo los cerdos más afectados los que tiene una edad de 3 meses como promedio (Sebunya y Saunders, 1983; Ross, 1985).

Este comportamiento clínico lo podemos dividir en dos fases las cuales serían:

a).- Fase de contagio.

Donde la difusión es rápida y explosiva y donde es más espectacular la manifestación de la enfermedad, por la muerte súbita de los animales y la presencia de hemorragia nasal. Cuando existe la posibilidad de observar a los animales antes de su muerte, se logran detectar los siguientes signos:

Fiebre hasta 41-42°C, anorexia, postración, tos, estornudos, respiración abdominal (brinco), marcada disnea, secreción nasal de tipo hialino que se vuelve sanguinolenta, hasta convertirse en franca hemorragia espumosa que sale por nariz y boca; en los animales de raza blanca se puede apreciar perfectamente una cianosis de la piel, abdomen y orejas, a la palpación existe dolor intenso a nivel del tórax con chillidos agudos, opistotonos y finalmente sobreviene la muerte a las pocas horas (Sebunya y Saunders, 1983; Sebunya y col. 1983; Didier y col. 1984; Nicolet y Ross, 1985).

b).- Fase de asentamiento.

A esta fase podemos llamarle también crónica y es cuando el animal sobrevive los primeros 5 días de la fase de contagio y es cuando difícilmente muere. Vemos que el sufrimiento respiratorio es menos grave y la tos menos persistente, pero cuando no se da el tratamiento adecuado a los cerdos, esta enfermedad entraña una elevada mortalidad. Este comportamiento se ve más en la etapa de recepción y crecimiento, en donde la mortalidad es variable, los cerdos están letárgicos como desvitalizados, puede haber fiebre, trastornos respiratorios secundarios, tos breve, vómito ocasional y poca ganancia de peso (Ross, 1985).

5).- HALLAZGOS MACROSCÓPICOS.

Se pueden observar las lesiones neumónicas como consecuencia de la necrosis causada por el H. pleuropneumoniae, en los lóbulos diafragmáticos principalmente, que se asocia con la friabilidad del tejido pulmonar y de la pleuritis fibrinosa acompañada con grandes adherencias (Sebunya y Saunders, 1933).

Al inicio de los brotes la mortalidad afecta a todas las edades, pero a medida que pasa el tiempo la enfermedad se limita a los corrales de engorda y finalización, causando grandes estragos debido a la mortalidad de los animales pesados (Ross, 1985).

Las lesiones que provoca la pleuroneumonía contagiosa se pueden dividir en aguda y crónica.

a).- Lesión aguda.

Sobresale una congestión marcada con infartos hemorrágicos localizados principalmente en los lóbulos diafragmáticos del pulmón, estas lesiones miden de 4-5 cm. de diámetro, en algunas ocasiones llegan a medir hasta 12 cm., existe friabilidad del tejido afectado y con la apariencia de una hepatización roja. En los casos hiperagudos los pulmones pueden presentar una inflamación y al corte de la zona afectada sale un líquido sanguinolento, además se encuentra una pleuresía fibrinosa con adherencias y exudación amarillenta de fibrina; en algunos casos la presentación de la lesión es unilateral y en otros los dos pulmones están afectados, siendo en estos últimos las lesiones más difundidas por los diferentes lóbulos (Cruz y Martínez, 1980; Sebunya y col. 1933; Olander, 1985).

b).- Lesión crónica.

Esta lesión es menos aparente, ya que la consolidación pulmonar de las zonas afectadas e infartadas están encapsuladas o secuestradas como si fuera un absceso y el tejido pulmonar se encuentra en un proceso de cicatrización de segunda intención y al corte la lesión da la impresión de un estado de resequeidad (Olander, 1985).

A nivel de rastro estas lesiones son consideradas como causa de decomiso, esto es importante porque el porcentaje de pulmones decomisados a causa de la pleuroneumonía contagiosa porcina, puede llegar del 2,28 % al 3,5 % del total de los pulmones decomisados por neumonía (Saunders y col. 1981; Pijoan, 1985; Morrinson y col. 1985).

La patogenia de la pleuroneumonía contagiosa porcina no es bien conocida, ya que las lesiones como la hemorragia, edema trombosis e infartos, indican que la vasculatura pulmonar es el blanco del ataque temprano de la infección. Hay algunas evidencias que explican este daño pulmonar, como el aislamiento de un producto extracelular bacteriano termoestable, que sugiere que la endotoxina puede ser envuelta, esto explica que cuando la endotoxina es activada provoque el desarrollo de la vasculitis y la trombosis, ya que el endotelio pulmonar del cerdo es más vulnerable al daño bacteriano que los endotelios de otros órganos, además esta endotoxina puede inducir o intercambiar el mensaje de los receptores de la IgG y el complemento y así evitar la reacción inmune del pulmón. Se ha demostrado que los efectos directos del H. pleuroneumoniae sobre la vascularización del

pulmón, pueden destruir a los macrófagos alveolares. También se ha demostrado la citotoxicidad del H. pleuroneumoniae sobre los monocitos de la sangre, lo que falta demostrar es si el endotelio pulmonar y los neutrófilos del cerdo son susceptibles a las toxinas del H. pleuroneumoniae, ya que si hay una gran afluencia de macrófagos mononucleares, no se explica la falta de neutrófilos en la lesión pleuroneumónica (Sebunya y Saunders, 1982; Didier y col. 1984).

#### 6).- INMUNIDAD.

El H. pleuroneumoniae produce la pleuroneumonía cuando logra introducirse hasta el alveolo, todo esto lo logra cuando sobrevive a la deshidratación del medio ambiente y cuando no es inactivado por el moco traqueo-bronquial; al llegar al alveolo, la bacteria es atacada por el macrófago alveolar, que es la célula de defensa encargada de fagocitar y destruir a las bacterias. Sin embargo, el macrófago no es primariamente fagocito ya que sus verdaderas funciones son el de la modulación de la respuesta inmune, por lo tanto el macrófago como fagocito no inmune es relativamente inactivo; vemos así que el macrófago alveolar está poco preparado para enfrentarse con una infección bacteriana, a menos que exista un estado inmune donde los anticuerpos y el complemento le ayuden en esta función (Pijoan, 1984). Ya en el alveolo, la bacteria puede resistir la fagocitosis gracias a su cápsula y después destruye al macrófago al secretar una poderosa toxina citocida para establecerse como una enfer-

edad (Didier y col. 1984).

Se sabe que la IgG presente actividad de fijación de complemento y sobre todo de opsonización, esta inmunoglobulina se encuentra en el alveolo, que es un sitio anatómico rico en macrófagos; mientras que la IgA la encontramos en las partes altas del tracto respiratorio, por lo que podemos decir que la IgG tiene a su cargo la actividad inmune del pulmón; lo anterior tiene importancia porque se ha observado que las bacterinas inoculadas por vía parenteral estimulan poco a la IgG en los sitios alveolares, dando como resultado que la mayoría de las bacterinas contra patógenos pulmonares den pocos resultados (Sebunya y col. 1983; Pijoan, 1984).

Los problemas de pleuroneumonía contagiosa porcina, aparecen cuando los niveles de inmunidad pasiva dados por la madre al lechón empiezan a declinar, esto es después de las 8 semanas de edad, ya que las primeras semanas de vida el lechón está protegido por los anticuerpos ingeridos en el calostro de la leche materna (Sebunya y Saunders, 1982; Nielsen, 1985; Ross, 1985).

Si tenemos en cuenta que bajan los niveles de anticuerpos después de las 8 semanas, aunado al hecho de que al mismo tiempo es el destete, con el consecuente estado de estrés que sufre el animal y con la cápsula tan potente que tiene el Haemophilus en su pared bacteriana, es lógico pensar en una inevitable infección cuando el H. pleuroneumoniae, está presente en el hato.

La inmunidad que se logra con el uso de las vacunas tiene las siguientes desventajas:

- a).- Estimulan poco a la IgG en los sitios alveolares.
- b).- Los adyuvantes utilizados estimulan poco al sistema inmunocompetente.
- c).- Las bacterinas utilizadas no son de los serotipos adecuados presentes en la región.
- d).- La utilización de demasiados antígenos en la misma vacuna llegan a dar un resultado pobre (Sebunya y Saunders, 1983; Pijon, 1984; Nielsen, 1985).

La inmunidad contra H. pleuropneumoniae es centro de muchas controversias, ya que no hay duda que las bacterinas preparadas con cultivos de 6 horas (capsuladas) y adyuvantes de Hidróxido de Aluminio previene la mortandad, sin embargo estas bacterinas no estimulan protección contra la infección, porque los cerdos vacunados desarrollan lesiones pulmonares y transmiten la infección a los demás cerdos (Sebunya y Saunders, 1983; Pijon, 1984; Nielsen, 1985).

La utilización de adyuvantes oleosos en vez de geles, resulta en una protección más eficaz contra Haemophilus, además de que los animales no desarrollan lesiones pulmonares y probablemente no transmitan la enfermedad; sin embargo desarrollan una lesión granulomatosa en el sitio de la inyección, que en el rastreo es una causa de decomiso en algunos países por parecer lesiones de tipo tuberculosis (Straw y col. 1985). Por último cabe mencionar que la vacunación contra Haemophilus puede resultar contraproducente, porque en algunas granjas que son afectadas sufren recrudescimiento de su estado clínico, ya que el número de microorganismos ingeridos por el macrófago pulmonar, si

este no ha sido inactivado por la inmunidad celular, resulta en la rápida muerte del macrófago, debido a las toxinas producidas por los Haemophilus fagocitados (Pijoan, 1984).

#### 7).- ESTUDIOS DE SEROTIPIFICACION.

En estudios que se han realizado en otros países respecto a la serotipificación, se ha descrito la existencia de varios serotipos, en 1971 Nicolet descubre inicialmente 3 serotipos, los cuales fueron serotipificados en base a su antígeno capsular, desde entonces a la fecha 6 serotipos adicionales han sido descritos (Pijoan, 1985).

En 1977 Gunnarsson describe los serotipos 4 y 5 que fueron también capsulares.

La naturaleza exacta del antígeno específico en los serotipos del 6 al 9 en el presente es desconocida, aunque existen algunas reacciones cruzadas entre los serotipos 4,7 y 3; 6 y 8; se dice que están relacionadas con un lipopolisacárido del antígeno (Pijoan, 1985).

Las pruebas más comúnmente utilizadas para la serotipificación del H. pleuropneumoniae son:

##### a).- Prueba de aglutinación.

Esta prueba es la más comúnmente utilizada por su facilidad y funcionalidad para la serotipificación, por su especificidad a un solo serotipo capsular; hay dos variaciones que son en tubo y en placa bajo el mismo principio.



Se hacen diluciones de antígenos de 6-7 horas de cultivo en solución salina formolizada al 0.1 %, se confrontan con los diferentes antisueros, presentandose la reacción de aglutinación cuando son positivos, aproximadamente después de los 30 segundos, apreciandose mejor a los 3 minutos de haberse confrontado (Gunnarsson y col., 1977).

b).- Prueba de Precipitación en tubo.

Esta prueba se lleva a cabo con cultivos de 18 horas, se prepara una suspensión en solución salina formolizada, se centrifuga y el sobrenadante se utiliza como antígeno; se corre en pipetas Pasteur donde se pone con su antisuero monoespecifico, se sella la pipeta y a los pocos minutos aparece claramente una línea de precipitación cuando es positivo. Esta prueba no se utiliza para la detección de anticuerpos en los cerdos infectados por ser de baja sensibilidad, pero se puede usar en sustitución de la prueba de aglutinación en casos de cultivos autoaglutinantes para su serotipificación (Pijoan, 1985).

c).- Prueba de Co-aglutinación.

La ventaja de esta prueba es que se puede adquirir el antígeno directamente del pulmón, de donde se toma una pieza pequeña del tejido pulmonar afectado de aproximadamente 2 gr, se tritura en 3 ml. de solución salina en un mortero, la suspensión del tejido pulmonar se conserva en un tubo requeño de vidrio, el cual es hervido en baño maría por 5 minutos y después se centrifuga a 8,000 rpm por 30 minutos y el sobrenadante es utilizado como antígeno. El antisuero es primeramente reactiva-

do con cultivos de Staphylococcus aureus Cowan I (con producción abundante de proteína A, en donde se pega el antisuero por medio de la fracción del complemento, para que quede expuesto el sitio activo); la suspensión del Staphylococcus-antisuero se deja reactivar por 30 minutos para lavarse con PBS y ser finalmente suspendida en PBS con 0.05 % de sodio y 0.1 % de albúmina de suero de bovino. Los cultivos de Staphylococcus-antisuero son confrontados con el antígeno del Haemophilus y si es positivo, la reacción de aglutinación se presenta antes de los 4 minutos, si no, quiere decir que es negativo (Mittal y col. 1985).

d).- Prueba de Fijación de complemento.

Esta prueba es la más estandar para la detección de anticuerpos de animales infectados, la prueba es corrida con cultivos de 6 horas en medios de PPLO inactivados con Merthiolate, se hacen diluciones en placas de microtítulos donde se adiciona el antisuero más el antígeno de H. pleuropneumoniae y 5 unidades de complemento de cobayo, además se emplea un sistema indicador que consta de glóbulos rojos con hemolisina como sensibilizador; las placas son incubadas por 30 minutos y centrifugadas a 1,500 rpm. por 5 minutos. La reacción se puede ver por medio del porcentaje de hemólisis producida, dándose como negativas las que tengan una hemólisis mayor del 30 %, y como positivas las que tengan una hemólisis menor de 30 %. Una de las dificultades más asociadas con la prueba de fijación de complemento es su relativa sensibilidad que puede dar ocasionalmente falsos positivos por la utilización de fármacos, así como falsos-nega-

tivos por el establecimiento de la infección en el hato, como la inoculación de adyuvantes oleosos en las vacunas (Lombin y col. 1982; Schultz y col. 1982; Pijoan, 1985).

e).- Prueba de ELISA.

El principio de esta prueba es la utilización de la enzima Peroxidasa junto con un suero específico con anticuerpos de cerdo, este suero es de cabra o de conejo. El antígeno es preparado en caldos de cultivo que son lavados, filtrados y el sobrenadante es utilizado como antígeno, al cual se le adiciona el antisuero para que reaccione y queden expuestos los sitios activos, que al adicionar el suero de cabra o de conejo con los anticuerpos del cerdo y la enzima Peroxidasa con  $H_2O_2$ , se ve la reacción por medio del cambio de coloración a negro si es positivo, esta prueba se corre convencionalmente en placas de plástico. Esta prueba es designada para la detección de anticuerpos en el suero de los animales y los serotipos utilizados son comúnmente polivalentes (Pijoan, 1985).

f).- Prueba de Aglutinación en tubo con 2-Mercaptoetanol.

La prueba se basa en la presencia del 2-Mercaptoetanol, el cual destruye selectivamente a la IgM en el suero para una mejor especificidad. El antisuero se diluye en solución salina formolizada, donde se le adiciona 0.15M de 2-Mercaptoetanol, se mezcla el antígeno con el antisuero y se incuba a  $37^{\circ}C$ , la prueba se lleva a cabo en tubos y la reacción de aglutinación se observa a simple vista. Esta prueba es altamente específica y más

sensible que otras pruebas de serotipificación, además se puede hacer en lechones de pocas semanas de edad y se puede utilizar para prevenir la enfermedad (Mittal y col. 1984; Pijoen, 1985).

Estas pruebas se pueden utilizar dependiendo del material disponible en el laboratorio donde se esté investigando al H. pleuropneumoniae.

7.1).- Distribución geográfica de los serotipos de Haemophilus pleuropneumoniae.

La distribución geográfica mundial de los 9 serotipos distintos que se encuentran actualmente de Haemophilus pleuropneumoniae, se expresan en la siguiente relación.

PAIS	SEROTIPO	PAIS	SEROTIPO
Argentina	<u>1</u>	México	no se había tipificado
Australia	<u>1,7</u>	Italia	<u>2,4,9</u>
Bélgica	<u>3,5</u>	Japón	<u>2,3</u>
Brasil	5	Rumania	5
Canadá	<u>1,2,3,5,7</u>	Suiza	<u>2,3,4</u>
Dinamarca	<u>2,6,8</u>	Suecia	<u>2,3,7,9</u>
Finlandia	2,5	Taiwan	5
Francia	<u>3,7,9</u>	Reino Unido	<u>2,3,8,9</u>
Alem. Fed.	<u>2,3,9</u>	E.U.A.	<u>1,3,4,5,7</u>
Alem. Dem.	2,5	Venezuela	7
Holanda	<u>5,9</u>	Yugoslavia	<u>2,4</u>

(Sebunya y Saunders, 1983; Nicolet, 1985).

Como podemos observar, la distribución de la pleuroneumonia contagiosa porcina es mundial, ya que podemos encontrar literatura sobre esta enfermedad en todas las revistas especializadas en veterinaria de todo el mundo (Sebunya y Saunders, 1983).

Hay algunos serotipos que son más comunes que otros, así tenemos por ejemplo que en Europa del Norte el serotipo que más predomina es el 2; en Gran Bretaña es el 3 (que no es patógeno) mientras que en los E.U.A., como en el Canadá los serotipos que predominan son el 1 y el 5 (Rosendal y col. 1981; Pijoan, 1984).

#### 8).- TRATAMIENTO.

Los cerdos enfermos y los que han entrado en contacto con ellos, deben de recibir un tratamiento parenteral con antibióticos; lo ideal es que se instituya pronto y antes de que la enfermedad se disemine en el hato porque los cambios vasculares provocados por el Haemophilus ocurren rápido, así como su encapsulamiento en los estados crónicos. Impiden y dificultan la actividad de los antimicrobianos en el sitio de la infección; los medicamentos inyectables son los más efectivos, ya que los animales en la fase aguda se encuentran anoréxicos y el darles los medicamentos en el alimento es poco benéfico, así como también en el agua ya que se reduce drásticamente la ingestión de ésta por aproximadamente 24 horas, por lo que se limita la utilización de los antibióticos durante el curso de la enfermedad. Los medicamentos inyectables como ya dijimos, son los más efectivos

y apropiados por un período de tiempo de aproximadamente 3-4 días, después de este control inicial se puede seguir con los antibióticos en la comida o en el agua, si el animal ha demostrado una mejoría se puede seguir con el tratamiento por 5-10 días; además se puede tener una previa vacunación a los cerdos si el tratamiento está dando buenos resultados (Schultz, 1985).

Los tratamientos no llegan a tener una respuesta satisfactoria y pueden resultar muy costosos, sin embargo, se han hecho trabajos "in vitro" donde se ha visto que el H. pleuropneumoniae, es sensible a la nitrofurazona y cloramfenicol en un 100%, penicilina 84 %, gentamicina 96 %, ampicilina 84 %, sulfacloropirazina 85 %; y es resistente a la bacitracina en un 95 %, novobiocina 87 %, sulfa triple 83 %, lincomicina 73 %, estreptomicina 77 % (Hirsh y col. 1982; Schultz y Ross, 1983; Inoue y col. 1984; Didier y col. 1984; Gilbride y Rosendal, 1984; Sidoli y col. 1984).

El combinar los antibióticos sensibles en sus dosis normales, ha llegado a dar mejores resultados. En la práctica clínica, el médico debe de indicar los antibióticos que den la mayor efectividad para controlar la infección por Haemophilus pleuropneumoniae (Schultz, 1983).

#### 9).- CONTROL Y PROFILAXIS.

Para tener un buen sistema de control y prevención de la pleuroneumonía contagiosa porcina, es extremadamente importante hacer la serotipificación de los aislamientos de H. pleuropneumoniae, ya que la determinación del serotipo implica el uso de

vacunas monovalentes para el control y prevención de la pleuro-neumonía contagiosa ya que son más efectivas que las vacunas polivalentes convencionales (Schultz, 1985; Pijoan, 1985).

El control se complica ya que la enfermedad se difundirá rápidamente y los antibióticos responden pobremente, por lo que se tiene que prevenir a los cerdos recién llegados por medio de la aplicación de la vacuna conjuntamente con antibióticos. Cuando en la granja se manejan ciclos completos y las reproductoras son las portadoras de la enfermedad, se recomienda vacunar a estas antes del parto para que por inmunidad pasiva por medio del colostro sean protegidos los lechones durante sus primeras semanas de vida (Ramírez, 1980; Sebunya y Saunders, 1983).

Sin embargo, la gravedad del problema ha obligado a tomar soluciones importantes en el manejo, en las vacunaciones y en el tratamiento como sería:

a).- Control zootécnico, Donde implica el control de la ventilación, espacio, temperatura, sistema "todos dentro-todos fuera" en las granjas de engorda, no introducir portadores sanos principalmente de las zonas enzooticas, llevar al rastro el ganado enfermo que tenga buen peso, bajar en un 20 % la población de la granja y así evitar un poco el contacto estrecho de los cerdos.

b).- Vacunación; Vacunar los cerdos recién llegados y los que no fueron llevados al rastro. Las vacunaciones deben de ser frecuentes y de preferencia con antígenos del serotipo regional

que esté afectando a la granja.

c).- Tratamiento: Debe de ser periódico conjuntamente con las vacunaciones, en las granjas donde ya existe la pleuroneumonía contagiosa porcina (Ramírez, 1980; Martineau y col. 1985).

#### 10).- ESTUDIOS REALIZADOS EN MEXICO.

En México se han realizado investigaciones sobre el H. pleuroneumoniae y aunque se ha identificado, la serotipificación de este microorganismo no se ha hecho. La pleuroneumonía contagiosa porcina se encuentra en todo el Territorio Nacional, desde la frontera con E.U.A. hasta la frontera con Belice y Guatemala; aunque originalmente estaba circunscrita en la zona de Guanajuato, Michoacán y Tlaxcala, donde se practica la crianza intensiva de cerdos. (Pijoan y col. 1978; Ramírez, 1980).

La pleuroneumonía contagiosa porcina se reportó en México por medio de la descripción clínica del problema por Ramírez en 1973 en Jilotepec, Edo. de México, siendo hasta 1978 cuando Pijoan y colaboradores por medio de estudios exhaustivos, pudieron aislar al Haemophilus causante de una epizootia en el Estado de Tlaxcala.

De entonces a la fecha, podemos decir que no existe cuenca porcina del país, donde no se haya registrado la enfermedad, como a continuación lo demuestra una relación cronológica de reportes en México recopilada por Ramírez en 1980.



LUGAR	AUTOR	AÑO
Jilotepec	Ramírez Necoechea	1973
Los Mochis	Ramírez Necoechea	1974
Tlaxcala	Piñan, Ochoa, Méndez y Lastra	1977
La Piedad	Ochoa, Piñan y Ramírez	1977
Sta. Ana Pacueco	Maqueda	1978
Sn. Bartolo del Llano	Maqueda	1978
Calixtlahuaca	Maqueda y Ramírez	1979
Cuautlapan	Ramírez Necoechea	1979
Saltillo	Ocaña y Fragoso	1980
Culiacán	Ocaña	1980

En la literatura nacional no se han encontrado estudios tendientes a la serotipificación de Haemophilus pleuropneumoniae.

OBJETIVOS.

- 1).- Determinar por medio de las lesiones macroscópicas, la incidencia de la pleuroneumonía contagiosa porcina en el rastro y frigorífico de Ferrería del Distrito Federal.
- 2).- Aislar e identificar al agente responsable, a partir de las lesiones pleuroneumónicas.
- 3).- Serotipificar el Haemophilus pleuropneumoniae

## MATERIAL Y METODOS.

### MATERIAL.

#### 1.- Biológico.

Pulmones neumónicos sospechosos de pleuroneumonía contagiosa porcina, muestreados por medio de la inspección de los pulmones de todos los cerdos de 30 matanzas, observadas durante 8 meses en el rastro de Ferrería, D.F., con un total de 41,060 cerdos de abasto.

#### 2.- Medios de cultivo.

a).- Primario: Se utilizaron cajas de agar sangre al 5% con cepa nodriza de Staphylococcus aureus, para el aislamiento en un cultivo primario tal como lo describen Gunnarsson, 1977; y Pijoan y col. 1978.

b).- Propagación: Se utilizó agar PPIO enriquecido con 5% de suero de caballo y 10% de extracto de levadura, para un mejor crecimiento en la purificación de la cepa de la bacteria de H. pleuroneumoniae, tal como lo describen Rapp y Ross, 1985.

c).- Bioquímicas: Se utilizaron las siguientes pruebas bioquímicas para la identificación:

Hemólisis	Glucosa
Ureasa	Arabinosa
Aesculina	Sorbitol
CAMP	Dulcitol
Manitol	Inositol
Fructosa	Motilidad, Indol, Sulfídrico.

Maltosa

VP (Voges-Proskauer)

Manosa

MR (Rojo de metilo)

(Kilian y col. 1978; Nicolet, 1985).

### 3.- Medios de serotipificación.

a).- Propagación: Se prepararon cultivos de 6-7 horas en caldo de PPLO con 5 % de suero de caballo y 10 % de extracto de levadura, para preparar diluciones en sol. salina formolizada al 0.1 %, para su posterior confrontación con los antisueros de H. pleuropneumoniae (Rapp y col. 1985).

b).- Serotipificación: Se realizó en el Departamento de Grandes Especies de la Universidad de Minnesota, por el Dr. Carlos Pijoan; en donde se llevó a cabo por medio de la prueba de aglutinación en placa. Los antisueros contra los serotipos de H. pleuropneumoniae trabajados fueron del 1 al 7.

## METODOLOGIA.

### 1.- Inspección.

a).- Inspección en el rastreo: Se hizo mediante la inspección de todos los pulmones de la matanza del día, esta inspección se llevó a cabo en el lugar destinado para los médicos inspectores, donde se nos permitió observar las vísceras que venían en unas charolas de cadena sin ffr, de donde se tomaban los pulmones neumónicos sospechosos de pleuroneumonía por Haemophilus pleuroneumoniae directamente.

b).- Bases de la inspección: Se realizó la observación y contabilidad de las neumonías totales de las matanzas observadas, para sacar un porcentaje de estas neumonías, de las cuales se tomaron todas las muestras sospechosas de H. pleuroneumoniae; estas muestras las dividimos por su tipo de lesión en lesión aguda, donde los pulmones presentaban mucha friabilidad de la zona afectada, además de mostrar una gran cantidad de áreas infartadas, principalmente en los lóbulos diafragmáticos del pulmón. La lesión crónica se clasificó por la poca extensión de la lesión, pocas zonas de infarto y por su proceso de cicatrización que presenta el pulmón en el área afectada.

c).- Toma de muestra: Se tomaron todos los pulmones sospechosos de pleuroneumonía contagiosa ya divididos en agudos y crónicos, se procedió a ponerlos individualmente en bolsas de polietileno, se sellaron y se identificaron con un número progresivo para llevar una estadística del porcentaje de pleuroneumonía que observamos en el rastreo; identificadas las muestras se

colocaron en un termo con hielo para su conservación mientras eran trasladados al laboratorio, donde fueron trabajados el mismo día que se colectaron.

## 2.- Aislamiento de Haemophilus pleuropneumoniae.

a).- Cultivo primario: De las muestras sospechosas de pleuroneumonía contagiosa porcina que se colectaron en el rastro, se tomó cada pulmón y se colocó en una charola limpia con mecheros de un lado y de otro para tener un campo lo más estéril posible. Con una espátula de acero inoxidable caliente al rojo vivo, se quemó la parte externa de la lesión para evitar contaminaciones, posteriormente con tijeras desinfectadas y expuestas al fuego se procedió a hacer un corte en la lesión y con una asa se tomó el exudado de la lesión y se sembró en cajas con agar sangre, a la que después se colocó la cepa nodriza de Staphylococcus aureus, estos cultivos se incubaron a 37°C por 24 horas tal como lo recomiendan Pigeon y col. 1978.

b).- Cultivo de propagación: Para purificar la cepa sospechosa de H. pleuropneumoniae, se utilizó un medio específico para microorganismos pulmonares que es el agar PFLO, al cual se enriqueció con 10 % de extracto de levadura y 5 % de suero de caballo.

Del cultivo primario se tomó una muestra de la colonia aislada y se sembró en este medio el cual se incubó a 37°C por 24 horas.

c).- Identificación: Después de haber aislado y purificado la cepa sospechosa de H. pleuropneumoniae, se procedió a la

identificación de la bacteria, para confirmar que el aislamiento es en efecto H. pleuropneumoniae, se realizaron pruebas bioquímicas de identificación para esta bacteria, estas pruebas se realizaron de acuerdo a Kilian (1978) y a Nicolet (1985).

Se tomó con una asa la colonia de bacterias y se colocó en cada uno de los tubos ya identificados (Hemólisis, CAMP, VP, IR, etc.), con cada uno de los reactivos que se utilizaron, se incubaron a 37°C durante 24 horas y se realizó la lectura.

### 3.- Serotipificación.

Se llevó a cabo en los laboratorios del Dpto. de Grandes especies de la Universidad de Minnesota E.U.A.

Se preparó un cultivo en medio líquido de PPLO de 12 horas, se centrifugó, se lavó con PBS y se resuspendió en solución salina formolizada al 0.1 % con una concentración de bacterias de  $10^7$ /ml. y se trasladó en frescos viales a E.U.A.

Se utilizó la prueba de "Aglutinación en placa" de acuerdo a Gunnarsson (1977); Schultz y col. (1983) y Rapp y col. (1985). Se realizó una suspensión de cada una de las cepas en sol. salina formolizada al 0.1 % y cada cepa se confrontó con cada uno de los antisueros correspondientes a los serotipos del 1 al 7 de H. pleuropneumoniae; se homogenizó la cepa con cada uno de los antisueros en una placa de vidrio y la reacción de aglutinación se observó a partir de los 30 segundos.

RESULTADOS.

1.- Inspección.

a).- Neumonías: Del total de 41,060 cerdos observados, 11,572 presentaron lesiones neumónicas, las cuales representan el 28.2 %.

b).- Pleuroneumonías: De las lesiones neumónicas, se caracterizaron como lesiones pleuroneumónicas, un total de 316 que representan el 2.73 % del total de las neumonías, de estas el 1.85 % fueron de lesiones agudas y el 0.88 % fueron de lesiones crónicas (ver cuadro 1).

CUADRO 1

Total de animales observados con neumonías y lesiones pleuroneumónicas.

	total de animales observados	con neumonías	lesiones pleuroneumónicas		
			agudas	crónicas	total
Nº de animales	41,060	11,572	214	102	316
porcentaje	100 %	28.2 %	1.85 %	0.88 %	2.73 %

2.- Aislamientos.

Se seleccionaron un 20 % de las muestras (63 pulmones) con pleuroneumonía contagiosa, de estos 42 fueron de lesiones agudas y 21 de lesiones de tipo crónico, teniendo aislamientos



de H. pleuropneumoniae en los 63 casos (100 %). De los cultivos primarios se observó la hemólisis así como la dependencia al Nicotin Adenin Dinucleotido (NAD), que fué determinado por el fenomeno de satelitismo hacia la cepa nodriza de S. aureus. Se obtuvieron colonias pequeñas, redondas, lisas y opacas; se le hizo tinción de Gram, la que resultó ser un cocobacilo Gram-negativo. A las colonias más sospechosas de los cultivos primarios se les hicieron cultivos de propagación en medios PPLO con levadura y suero de caballo. Que dió como resultado que estos cultivos demostraron las mismas características morfológicas de los cultivos primarios, siendo la purificación de la cepa positiva. En la identificación de estas cepas, las pruebas bioquímicas dieron como resultado lo siguiente:

CUADRO 2

Resultados de las características bioquímicas del Haemophilus pleuropneumoniae.

PRUEBA	RESULTADO	PRUEBA	RESULTADO
Hemólisis	+	Glucosa	+
Ureasa	+	Arabinosa	-
Aesculina	+	Sorbitol	-
CAMP	+	Dulcitol	-
Manitol	+	Inositol	-
Fructosa	+	SIM (sulfídrico, motilidad, indol)	-
Maltosa	+	(Voges- VP Proskauer)	-
Manosa	+	Rojos de Metilo	-

Dichas características nos permitieron clasificar a la bacteria como Haemophilus pleuropneumoniae.

### 3.- Serotipificación.

El resultado se vió después de los 30 segundos, pero fué mejor después de los 3 minutos de haberlos confrontado, de los cuales el total de los 63 aislamientos fueron identificados como Haemophilus pleuropneumoniae SEROTIPO 1.

Este resultado se corroboró en el Instituto de Investigación de Medicina Veterinaria de la Universidad del Estado de Iowa, E.U.A., por el Dr. Ross.

## DISCUSION.

### 1.- Inspección.

Del total de cerdos observados solo el 1.85 % presentaron lesiones agudas y el 0.83 % presentaron lesiones crónicas de pleuroneumonía contagiosa porcina; es importante señalar que el porcentaje encontrado en esta inspección es sumamente baja, debido a que los animales muestreados fueron sacrificados en el rastro y no murieron por causa de la enfermedad; aunque este porcentaje está dentro de los parámetros que marcan Saunders y col (1981) y Morrison y col. (1985), los cuales encontraron de 2.23 al 3.8 % de pulmones con lesiones de pleuroneumonía contagiosa porcina y el porcentaje encontrado en este trabajo fue de 2.73 %.

Por otro lado cabe señalar que estos animales de abasto, proceden de diferentes estados productores de cerdos como; Michoacán, Jalisco, Sonora y Guanajuato principalmente, donde en alguno de ellos si no en todos, la pleuroneumonía contagiosa porcina es una enfermedad endémica.

### 2.- Aislamientos.

Es importante señalar que la bacteria para su crecimiento requirió del factor V (Nicotin Adenin Dinucleotido), pero su identificación final se llevó a cabo con la utilización de las pruebas bioquímicas como: CAMP, hemólisis, Ureasa, SIM, VP, MR, Glucosa, etc., las cuales coincidieron con las reportadas por Killian y col. (1978) y Nicolet (1985).

### 3.- Serotipificación.

Se hizo la serotipificación por medio de la prueba de "Aglutinación en placa", reportada por Gunnarsson y col. (1977) Schultz y col. (1933) y Rapp y col. (1985); empleando 7 antisuecos homólogos y no se observó que existieran cepas auto-aglutinantes, como lo reportan Pijoan (1985) y Mittal y col. (1985) sin embargo, la serotipificación se llevó a partir de una colonia bacteriana (clona) de un cultivo primario y hay que tener en cuenta, que en un primoaislamiento pueden estar involucrados uno o más serotipos; por lo que es importante señalar que se deben de intentar otras técnicas de serotipificación, tales como la prueba de la proteína A conjugada, que se realiza a partir de bloques de agar con colonias de Haemophilus pleuropneumoniae, los cuales se enfrentan con los diferentes serotipos.

En cuanto al serotipo identificado en este estudio, correspondió al SEROTIPO 1 de Haemophilus pleuropneumoniae; hallazgo que esperabamos debido a la comercialización de vientres y sementales con los E.U.A., donde los serotipos predominantes son el 1 y el 5, de los cuales el 1 es el de mayor patogenicidad.

Para un control y profilaxis de la pleuroneumonía contagiosa porcine, es importante que el aislamiento e identificación del H. pleuropneumoniae se confirme, así como la serotipificación se lleve a cabo para que la elaboración de los inmunógenos tengan los antígenos adecuados, tanto para el diagnóstico como para la inmunización.

CONCLUSIONES.

a).- Del total de los 41,060 cerdos de abasto observados en el rastreo, 316 presentaron lesiones de pleuroneuronia contagiosa porcina, de donde se aislaron, identificaron y serotipificaron un total de 63 cepas de Haemophilus pleuroneumoniae SEROTIPO 1.

b).- La prueba de "Aglutinación en placa" es sencilla y rápida, siempre y cuando tengamos los antisueros homólogos de Haemophilus pleuroneumoniae

c).- La serotipificación de Haemophilus pleuroneumoniae SEROTIPO 1, es hasta el momento la primera serotipificación reportada en México.

RECOMENDACIONES.

a).- La inspección y muestreo se podría hacer a nivel de granjas y serotipificar el Haemophilus pleuropneumoniae, para la producción de una bacterina de campo regional, para una mejor protección inmune del animal y así reducir un poco las pérdidas económicas que causa la pleuroneumonía contagiosa porcina en el hato.

b).- Valdría la pena investigar la utilización y desarrollo de varias pruebas serológicas, para descubrir a los cerdos portadores sanos en la selección de animales para la población o repoblación de un hato, principalmente de las zonas endémicas de pleuroneumonía contagiosa porcina.

c).- Se recomienda la continua investigación de este microorganismo, para una futura bacterina que dé mejores resultados a nivel de campo.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Cruz J. y Martínez R. (1980): Estudio sobre la respuesta inmune en cerdos inoculados con Haemophilus paraehaemolyticus. Tesis de Lic. M.V.Z., presentada en la ENEP-Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.
- 2.- Didier P.J.; Perino B.S. and Urbance J. (1984): Porcine Haemophilus pleuropneumoniae: Microbiologic and pathologic findings. JAVMA. 184: 716-719.
- 3.- Gilbride K.A. and Rosendal S. (1984): Antimicrobial Susceptibility of Haemophilus pleuropneumoniae. Can. J. Comp. Med. 48: 47-50.
- 4.- Gilbride K.A. and Rosendal S. (1983): Evaluation of a Selective Medium for Isolation of Haemophilus pleuropneumoniae. Can. J. Comp. Med. 47: 445-450.
- 5.- Gunnarsson A. (1979): Serologic Studies on Porcine Strains of Haemophilus paraehaemolyticus (pleuropneumoniae): Extraction of Type-Specific Antigens. Am. J. Vet. Res. 40:469-472.
- 6.- Gunnarsson A.; Biberstein E.L. and Hurvell B. (1977): Serologic Studies on Porcine Strains of Haemophilus paraehaemolyticus (pleuropneumoniae): Agglutination Reactions. Am. J. Vet. Res. 38: 1111-1114.

- 7.- Gunnarsson A.; Hurvell B. and Biberstein E.L. (1978): Sero-  
logic Studies of Porcine Strains of Haemophilus paraaemoly-  
ticus (pleuropneumoniae): Antigenic Specificity and Rela-  
tionship Between Serotypes. Am. J. Vet. Res. 39: 1286-1290.
- 8.- Hirsh D.C.; Martin L.D. and Libal M.C. (1982): Plasmid-me-  
diated antimicrobial resistance in Haemophilus pleuropneumo-  
niae. Am. J. Vet. Res. 43: 269-272.
- 9.- Inoue A.; Yamamoto K.; Hirano N. and Murakami T. (1984):  
Drug Susceptibility of Haemophilus pleuropneumoniae Strains  
Isolated from Pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 46: 175-180.
- 10.- Kilian M.; Nicolet J. and Biberstein E.L. (1978): Biochemi-  
cal and Serological Characterization of Haemophilus pleurop-  
neumoniae (Matthews and Pattison 1961) Shope 1964 and Propo-  
sal of a Neotype Strain. Int. J. Syst. Bact. 28: 20-26.
- 11.- Lombin L.E.; Rosendal S. and Mitchell W.R. (1982): Evalua-  
tion of the Complement Fixation Test for the Diagnosis of  
Pleuropneumonia of Swine Caused by Haemophilus pleuropneumo-  
niae. Can. J. Comp. Med. 46: 109-114.
- 12.- Martineau G.P.; Higgins R.; Lariviere S.; Mittal K.R.; Vai-  
llancourt j. and Desrosiers R. (1985): Eliminations an Con-  
trol Measures for Swine pleuropneumonia in Quebec. Annual  
Meet. Am. Assoc. Swine Pract. March 24-26:39-42.



- 13.- Mason R.W.; McKay R.V. and Corbould A. (1982): Field Test-  
ing of a Killed Haemophilus paraaemolyticus Vaccine in  
Pigs. Austr. Vet. J. 58: 106-110.
- 14.- Mittal R.; Higgins R.; Lariviere S. and Leblanc. (1984): A  
2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of  
Haemophilus pleuropneumoniae infection in pigs. Am. J. Vet.  
Res. 45: 715-719.
- 15.- Mittal K.R.; Higgins R.; Lariviere S. and Martineau G.P. \_  
(1985): Use of Co-agglutination Test for Direct Detection \_  
and Serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae. Annual Meet  
Am. Assoc. Swine Pract. March 24-26; pp 28-33.
- 16.- Morrison R.E.; Pijoan C.; Hilley H.D. and Rapp V. (1985):  
Microorganisms Associated with Pneumonia in Slaughter Wei-  
ght Swine. Can. J. Vet. Med. 49: 129-137.
- 17.- Nicolet J. (1985): Haemophilus pleuropneumoniae Bacteriolo-  
gy and Epidemiology. Annual Meet. Am. Assoc. Swine Pract. \_  
March. 24-26: pp 7-11.
- 18.- Nielsen R. (1985): Haemophilus pleuropneumoniae Diagnosis,  
Immunity and Control. Annual Meet. Am. Assoc. Swine Pract.  
March 24-26: pp 18-22.

- 19.- Olander H.J. (1985): The Pathology of Haemophilus pleuropneumoniae Infection of Swine. Annual Meet. Am. Assoc. Swine Pract. March 24-26: pp 12-17.
- 20.- Osborne A.D.; Saunders J.R. and Sebunya T.K. (1981): An Abattoir Survey of the Incidence of Pneumonia in Saskatchewan Swine and an Investigation of the Microbiology of Affected Lungs. Can. Vet. J. 22: 82-85.
- 21.- Pijoan C. (1984): Etiología, inmunidad y patogenia de las enfermedades respiratorias del cerdo. Med. Vet. 11: 517-524.
- 22.- Pijoan C. (1985): Serology and Immunology of Haemophilus pleuropneumoniae. Annual Meet. Am. Assoc. Swine Pract. March 24-26: pp 23-27.
- 23.- Pijoan C.; Ochoa G.; Méndez D. y Lastra A. (1978): Aislamiento de Haemophilus paraahaemolyticus de cerdos con neumonía. Tec. Pec. Méx. 34: 85-87.
- 24.- Ramírez Necoechea (1980): Neumonía hemorrágica del cerdo (neumonía por Haemophilus paraahaemolyticus). Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, D.F.

- 25.- Rapp V.J.; Ross R.F. and Zimmermann E.B. (1985): Serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. Am. J. Vet. Res. 46: 185-192.
- 26.- Rosendal S.L.; Lombin L. and DeMoor J. (1981): Serotyping and Detection of Haemophilus pleuropneumoniae by Indirect Fluorescent Antibody Technique. Can. J. Comp. Med. 45:271-274.
- 27.- Rosendal S.L. and Mitchell W.R. (1983): Epidemiology of Haemophilus pleuropneumoniae Infection in Pigs: A Survey of Ontario Pork Producers, 1981. Can. J. Comp. Med. 47: 1-5.
- 28.- Ross R.F. (1985): Research Needs for Pleuropneumonia. Annual Meet. Am. Assoc. Swine Pract. March 24-26:pp 43-46.
- 29.- Sanford S.E. and Josephson G.K.A. (1981): Porcine Haemophilus pleuropneumoniae Epizootic in Southwestern Ontario: Clinical, Microbiological, Pathological and Some Epidemiological Findings. Can. J. Comp. Med. 45: 2-7.
- 30.- Saunders J.R.; Osborne A.D. and Sebunya T.K. (1981): Pneumonia in Saskatchewan Swine: Abattoir Incidence of Intrathoracic Lesions in Pigs from a Herd Infected with Haemophilus pleuropneumoniae and from Other Herds. Can. Vet. J. 22:244-247.

- 31.- Schultz R.A. (1985): Haemophilus pleuropneumoniae of Swine: Prevalence, Treatment, Control and Prevention. Annual Meet. Am. Assoc. Swine Pract. March 24-26: pp 34-39.
- 32.- Schultz R.A. and Ross R.F. (1983): Antibiotic and sulfonamide sensitivity of 50 Haemophilus pleuropneumoniae isolates. Vet. Med. Small. Anim. Cli. April: pp 603-605.
- 33.- Schultz R.A.; Ross R.F.; Gunnarsson A. and Nielsen R. (1983): Serotyping of 50 different isolated of Haemophilus pleuropneumoniae from swine pneumonia in Iowa and Surrounding states. Vet. Med. Small. Anim. Cli. 78: 1451-1453.
- 34.- Schultz R.A.; Young T.F. and Jeske D.R. (1982): Prevalence of antibodies to Haemophilus pleuropneumoniae in Iowa swine. Am. J. Vet. Res. 43: 1848-1851.
- 35.- Sebunya T.N.K. and Saunders J.R. (1982): Studies on immunity to Haemophilus pleuropneumoniae infections in mice. Am. J. Vet. Res. 43: 1793-1798.
- 36.- Sebunya T.N.K. and Saunders J.R. (1982): Pulmonary clearance of Haemophilus pleuropneumoniae and Serratia marcescens in mice. Am. J. Vet. Res. 43: 1799-1801.

- 37.- Sebunya T.N.K. and Saunders J.R. (1983): Haemophilus pleuro pneumoniae infection in swine: A review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 182: 1331-1337.
- 38.- Sebunya T.N.K.; Saunders J.R. and Osborne A.D. (1982): Characteristics of Haemophilus pleuropneumoniae Isolated and Some Epidemiological Findings on Porcine Haemophilus Pleuro pneumonia in Saskatchewan. Can. Vet. J. 23: 224-228.
- 39.- Sebunya T.N.K.; Saunders J.R. and Osborne A.D. (1983): A Model Aerosol Exposure System for Induction of Porcine Haemophilus Pleuropneumonia. Can. J. Comp. Med. 47: 48-53.
- 40.- Sebunya T.N.K.; Saunders J.R. and Osborne A.D. (1983): Dose Response Relationship of Haemophilus pleuropneumoniae Aerosols in Pigs. Can. J. Comp. Med. 47: 54-56.
- 41.- Sidoli.; Barigazzi.; Schianchi and Russell S.B. (1984): Minimum inhibitory concentrations of antibacterial agents against strains of Haemophilus pleuropneumoniae from swine. Vet. Med. May: pp 703-705.
- 42.- Straw B.E.; MacLachlan N.J.; Corbett W.T.; Carter P.B. and Sehey H.M. (1985): Comparison of Tissue Reactions Produced by Haemophilus pleuropneumoniae Vaccines Made with Six Different Adjuvants in Swine. Can. J. Comp. Med. 49: 149-151.