

53<sup>A</sup>  
2oj



Universidad Nacional Autónoma  
de México



Facultad de Estudios Superiores  
CUAUTITLÁN

**VALIDACION DEL PLEUROTTEST ☆ A BASE DE**  
**Actinobacillus pleuropneumoniae**  
**SEROTIPO 1 A NIVEL DE GRANJA Y RASTRO**  
☆ (marca registrada por la unam)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A  
MA, DEL CARMEN LUGO RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS

MYZ., M. en C., Dr. en C. ABEL CIPRIAN CARRASCO

Cuautitlán, Izcalli, Edo. de México

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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

	Páginas
Introducción	1
1. Generalidades de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP)	1
2. Antecedentes.	2
2.1. Características del agente de la PCP.	3
2.2. Características morfológicas y bioquímicas.	4
2.3. Antígenos capsulares.	5
3. Métodos de diagnóstico.	8
3.1. Diagnóstico clínico	8
3.2. Lesiones macroscópicas y microscópicas.	11
3.2.1. Lesiones macroscópicas.	11
3.2.2. Lesiones microscópicas.	13
3.3. Diagnóstico bacteriológico.	14
3.4. Diagnóstico serológico.	16
3.4.1. Prueba de Fijación de Complemento.	16
3.4.2. Prueba de ELISA.	17
3.4.3. Prueba de aglutinación.	18
3.4.3.1. Prueba de aglutinación en tubo.	18
3.4.3.2. Prueba de 2-Mercaptoetanol.	19
3.4.3.3. Prueba de aglutinación con partículas de látex.	19
3.4.3.4. Prueba de hemaglutinación indirecta.	21
3.4.3.5. Prueba de aglutinación en placa.	21
3.4.4. Prueba de precipitación.	22
3.4.4.1. Prueba de precipitación en tubo	22

3.4.4.2. Prueba de precipitación en placa.	22
3.4.5. Prueba de coagulación.	23
3.4.6. Prueba de inhibición de la hemólisis.	24
3.4.7. Prueba de inmunotransferencia.	25
3.4.8. Prueba de radioinmunoensayo.	25
4. Antecedentes del PLEUROTTEST	27
4.1. Explicación de la prueba.	28
4.2. Principios del procedimiento.	29
4.3. Aportación del PLEUROTTEST a la porcicultura.	30
5. Objetivos.	31
6. Material y método.	32
7. Resultados.	35
8. Discusión.	44
9. Conclusión.	50
10. Bibliografía.	51

## INDICE DE CUADROS

	Páginas
1.-Características bioquímicas del <u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u>	6
2. Distribución de los serotipos por países	9
3. Serotipos de <u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u> recuperados de cerdos en México	10
4. Relación de los pulmones colectados en el rastro con diferentes lesiones	37
5. Aislamientos obtenidos de los pulmones con los diferentes tipos de lesiones	38
6. Resultados obtenidos con PLEUROTTEST y los obtenidos a partir de los pulmones con los diferentes tipos de lesiones.	41
7. Comparación de dos pruebas serológicas con el ensayo PLEUROTTEST.	42

## RESUMEN

**PLEUROTTEST** es una prueba de aglutinación en placa destinada para identificar directamente los anticuerpos capsulares de los diferentes serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae, a partir de sueros de cerdos de cualquier edad. **PLEUROTTEST** es un equipo diseñado para detectar anticuerpos en cerdos infectados con Actinobacillus pleuropneumoniae, ensayo que determina al instante si un cerdo está infectado de pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP) mediante una simple prueba de aglutinación en placa, diferenciando aquellos anticuerpos de cerdos que han sido vacunados contra la PCP.

Para esto fue necesario relacionar las lesiones pulmonares, el aislamiento bacteriológico con el paquete de diagnóstico serológico denominado **PLEUROTTEST**, con muestras de suero y pulmón del mismo animal obtenidas en rastro. De esta forma se colectaron 293 pulmones con sus respectivos sueros.

Los pulmones se clasificaron de acuerdo al tipo de lesión neumónica que presentaron: consolidación gris-rojiza (CGR); consolidación gris (CG); consolidación fibrino hemorrágica (CFH); áreas con focos necróticos (secuestros) y sin cambios patológicos aparentes (SCPA).

A partir de las lesiones pulmonares se sembraron y a los aislamientos sospechosos se les realizaron pruebas bioquímicas para su identificación. Los sueros colectados de rastro y de granja, fueron probados con **PLEUROTTEST**.

Las lesiones encontradas en los pulmones colectados del rastro fueron muy variadas y se resume en lo siguiente: CG 29.3% ; CGR 18.4%; CFH 21.8% ; secuestros 1.8% y SCPA 28.7%.

Se logró el aislamiento de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1 el cual fue identificado en un bajo porcentaje (3.4 %) por la prueba serológica PLEUROTTEST.

Al problema de la pleuroneumonía contagiosa porcina en el país, al parecer no se le a dado la importancia adecuada, por lo que se considera que este problema es mucho más grave que otras enfermedades del cerdo, de las cuales ya existen campañas de control y erradicación.

## INTRODUCCION

### 1. Generalidades de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP).

Las neumonías de los cerdos es uno de los problemas de más gravedad en algunas explotaciones, no tanto por las bajas que se producen por la mortalidad, sino por las graves pérdidas económicas debidas al retardo en el crecimiento de los animales, al mayor consumo de alimento y a los decomisos que pueden presentarse en los rastros. En el problema están involucrados tanto factores del medio ambiente, alimentación, manejo, etc., como una variable cantidad de virus y bacterias, estos varían de país a país y en ocasiones de región a región (Flores 1988).

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa porcina, mil de estas bacterias pueden matar a un cerdo de 50 Kg. de peso en solo 8 a 12 horas. Entre los factores que predisponen a los problemas respiratorios se encuentran los cambios bruscos de temperatura, malas condiciones de higiene, stress debido al manejo y adquisición de nuevos animales (Pijoan 1985).

Algunos autores consideran que el factor más importante es la densidad de la población animal (Landquist 1974; Schultz 1985) y otros estudios muestran que el manejo y el ambiente juegan un papel muy importante en la incidencia y gravedad de las neumonías (Bjorlund 1965; Landquist 1974; Tielsen 1978).

Esta enfermedad produce en cerdos susceptibles una alta mortalidad y pérdidas económicas debido a una pobre conversión alimenticia en los cerdos afectados crónicamente (Sebunya y cols 1983).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La transmisión del Actinobacillus pleuropneumoniae se lleva a cabo fundamentalmente por contacto directo, este modo de transmisión se intensifica cuando:

- a) Se utilizan corrales y jaulas que permiten en contacto.
- b) Se mezclan constantemente animales de diferentes grupos (Schultz 1985).

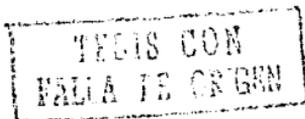
La presencia de portadores sanos juega un papel importante en la transmisión y diseminación de la enfermedad presentándose muerte súbita en los animales susceptibles que se encuentran en el periodo de finalización de la engorda y los que sobreviven los primeros cinco días transmiten la enfermedad tanto a cerdos de destete como a los de engorda y los brotes se presentan súbitamente detectándose por la muerte de algunos cerdos en la granja (Nielsen 1974).

## 2. Antecedentes

En 1963, Olander aisló una bacteria de una neumonía en cerdos la cual requería para su crecimiento el factor V (NAD) nicotinamín adenosín dinucleótido, que producía una marcada hemólisis en agar sangre por lo que se le denominó Haemophilus parahemolyticus, primer reporte realizado en California, E.U.

Ese mismo año en Argentina se investigó un brote de pleuroneumonía de tipo agudo en cerdos y al agente causal se le denominó Haemophilus pleuropneumoniae (Pittman 1953; Shope 1964).

La importancia de la enfermedad fue evidente en los años 70<sup>a</sup> cuando hubo muchos reportes e investigaciones extensivas en Europa como las de Nicolet 1968, Little y Harding 1971, Gunnarson y cols 1978; en Australia por Myrlea y cols 1974; en Taiwan por Hsu y cols. 1976; en Japón por Chang y cols. 1978; en los Estados Unidos por Cole y cols. 1978, y en Canada por Sanford y Josephson 1981.



En la actualidad al ampliarse el estudio sobre este microorganismo se le ha reubicado en el género Actinobacillus denominándolo Actinobacillus pleuropneumoniae (Pohl y cols. 1983).

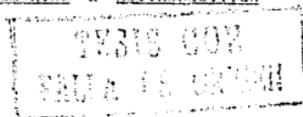
## 2.1. Características del agente de la PCP.

Actinobacillus pleuropneumoniae, el agente infeccioso de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP) fue caracterizado por primera vez a principio de los años 1960. Por un cuarto de siglo este ha sido el objetivo de intensas investigaciones para identificar al agente y definir sus factores de virulencia, como lo son su cápsula, hemolisinas y lipopolisacáridos capsulares. Debido a esos factores esta pequeña bacteria cocobacilar gram (-) requiere nicotina amida adenina dinucleótido (NAD) para su crecimiento y gracias a esta particularidad bioquímica y propiedades fisiológicas, (Kilian y cols. 1979) propuso el nombre de Haemophilus pleuropneumoniae.

En años recientes usando técnicas de homología del DNA han demostrado que bacterias de los géneros Haemophilus, Pasteurella y Actinobacillus pueden ser incluidos en un solo grupo el así llamado grupo HPA mostrando un alto nivel de relación genética (Pohl 1983).

Estas observaciones deberán de considerarse en la actual nomenclatura de ciertas bacterias de este grupo. El hallazgo de que una bacteria 'Pasteurella - like' ha sido capaz de producir lesiones pulmonares similares en cerdos allenta futuras investigaciones (Bertschinger y col. 1978).

Recientemente se han aislado del tracto respiratorio del cerdo cepas que requieren NAD (Haemophilus pleuropneumoniae) y cepas independientes de NAD (recientemente llamadas Pasteurella - like) las cuales son idénticas fenotípicamente, por esto se ha propuesto el cambio de nombre de Haemophilus pleuropneumoniae a Actinobacillus



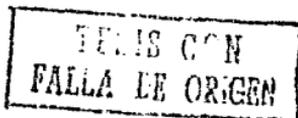
pleuropneumoniae, y para distinguir entre las cepas que requieren NAD se han denominado biovariedad 1 y las cepas independientes al NAD se han llamado biovariedad 2 (Phol y cols. 1983; Schultz 1985).

## 2.2. Características morfológicas y bioquímicas

Actinobacillus pleuropneumoniae es un cocabacilo gram (-), fermentativo, bastoncillo pleomorfo con formas filamentosas ocasionales de aproximadamente 0.5  $\mu$  a 1.5  $\mu$  de largo y 0.3  $\mu$  de diámetro, son inmóviles, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, para su crecimiento requiere de NAD el cual es pobre y hasta inexistente en agar sangre a menos que se encuentre presente NAD producido por bacterias como por ejemplo Staphylococcus aureus. Las colonias son grises y opacas en agar chocolate; se pueden observar dos tipos de colonias; unas redondas, duras 'serosas' que se parecen a otras especies del género Actinobacillus y colonias más planas, blandas que son más características del género Haemophilus (Killian y cols. 1984).

En medios claros como el de agar infusión cerebro corazón complementado con 5  $\mu\text{g/ml}$  de NAD las colonias encapsuladas son iridiscentes, las colonias son CAMP (+) por un sinergismo entre una cohemolisina de Actinobacillus pleuropneumoniae y la toxina  $\beta$  de Staphylococcus aureus (Frey y cols. 1989).

Actinobacillus pleuropneumoniae presenta una variedad de factores de virulencia entre los cuales se pueden mencionar algunas hemolisinas de pesos moleculares variados que comprende desde los 27 a 107 kilodaltons (Kd). La hemolisina de 104 Kd ha sido sujeta a estudios por su toxicidad en cultivos celulares (Frey 1988). La hemolisina de 27 Kd a presentado un efecto sinérgico con la toxina  $\beta$  de Staphylococcus a la cual se le atribuye un efecto de CAMP positivo



(Frey 1989).

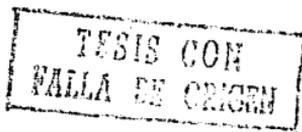
Otro factor importante de virulencia de Actinobacillus pleuropneumoniae es su cápsula, la cual a sido purificada por precipitación del sobrenadante del cultivo con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Cetavlon) seguido por la extracción con NaCl y fenol seguido de cromatografía de columna (Inzana y cols. 1987, 1990). En la capsula se encuentran los antígenos de superficie responsables de la existencia de diferentes serotipos.

Actinobacillus pleuropneumoniae presenta también lipopolisacáridos los cuales tienen una actividad biológica semejante a la de otras bacterias gram negativas e induce una reacción positiva en las reacciones dérmicas de Schwartzman, respuestas pirógenas, mortalidad de embriones de pollo y respuestas blastogénicas de los linfocitos de sangre periférica (Fendwick 1986).

La caracterización bioquímica de Actinobacillus pleuropneumoniae se realiza principalmente por la utilización de carbohidratos y pruebas adicionales las cuales están resumidas en el cuadro 1. (Cowan y Steel 1974; Mac Faddin 1980).

### 2.3. Antígenos capsulares.

En la literatura se reporta la existencia de 12 serotipos diferentes de Actinobacillus pleuropneumoniae los cuales varían únicamente por cambios en la estructura del polisacárido capsular por sustitución de un azúcar por otra constituida principalmente por glucosa, galactosa N - acetil glucosamina y N - acetil galactosamina, aunque se encuentran presentes azúcares poco usuales como el ácido 3 - deoxi - D manno - 2 octolosónico presente en el serotipo 5 (Inzana 1987).



Cuadro 1. Características bioquímicas del  
A. pleuropneumoniae

PRUEBA	RESULTADO
Factor V	+
Factor X	-
Catalasa	d
Nitratos	+
Oxidasa	d
Urea	+
Indol	-
Citrato	-
Voges-Proskauer (VP)	-
Rojo de metilo	-
Hemolisina $\beta$	+
Lactosa	-
Ribosa	-
Xilosa	+
Arabinosa	-
Dulcitol	-
Inositol	-
Dextrosa	+
Fructuosa	+
Maltosa	L
Manitol	L
Fosfatasa alcalina	+
CAMP	+

Factor V = Nad  
 Factor X = Hemina  
 L = Ligero  
 d = dudoso

Los serotipos 1, 2 y 3 fueron propuestos por Nicolet (1971) con base en sus estudios de aglutinación cruzada en los cuales definió tres serotipos basándose en los antígenos de tipo específico asociados a la cápsula.

Posteriormente Gunnarson (1977) descubre los serotipos 4 y 5 con lo que se amplía la clasificación, Nielsen (1974) propuso la existencia del serotipo 6 y Rosendal (1982) la existencia del serotipo 7, Nielsen (1984) propone la caracterización del serotipo 8 y el mismo reporta haber encontrado los serotipos 10, 11 y 12.

Este microorganismo está ampliamente distribuido a nivel mundial pero los serotipos varían en su distribución de un país a otro y la virulencia de cada serotipo es variable, mientras que en un país por ejemplo Australia reportan la prevalencia de los serotipos 1 y 7, y en Brasil se encuentran los serotipos 1, 3, 4 y 5 siendo los más patógenos el 1 y el 5 respectivamente (Cuadro 2) (Stephano y cols. 1990).

En México los primeros brotes de la enfermedad fueron observados en 1976 en la Piedad Michoacán y reportados por Píjman y cols. (1978).

En esos años en el área de la Piedad, la porcicultura estaba dedicada casi exclusivamente a la engorda, más que a la cría de cerdos, continuamente se introducían a las granjas cerdos de diferente origen, se mezclaban, se lotificaban por tamaño y se engordaban en condiciones generalmente desfavorables para el cerdo.

Este tipo de manejo favoreció el que en ese año se presentarán brotes severos de esa enfermedad, que ya para entonces estaba causando estragos en E.U. y Canadá, países que tenían un comercio activo de cerdos con poricultores del bajo. A partir de 1976 la enfermedad fue afectando rápidamente las principales áreas porcícolas del país (Stephano y cols. 1990).

Posteriormente continuando con las investigaciones Ciprián y cols (1988) en un estudio elaborado en animales de abasto reporto solo la resencia del serotipo 1 en el país.

Así mismo, Díaz y cols (1989) realizaron un estudio en las principales zonas porcícolas del país, encontrando una alta prevalencia del serotipo 1 en la mayoría de las zonas pero además detectaron la presencia de los serotipos 2,3,4,5,6,7 y 8 los cuales se encuentran distribuidos en menor proporción (Cuadro 3).

### 3. Métodos de diagnóstico.

#### 3.1. Diagnóstico clínico.

La enfermedad puede ser peraguda, aguda o crónica (Nicolet y cols 1969; Nielsen 1982 y Shope 1964). En piaras completamente susceptibles a la pleuroneumonía tienen un inicio repentino extendiéndose rápidamente y afectando a cerdos de todas las edades, incluyendo animales de cría (Nielsen 1985).

Generalmente el aviso de la enfermedad es dado por el granjero cuando varios cerdos tienen una repentina pérdida de apetito y fiebre alta (40 - 43 °C). En casos rápidos y graves estos signos iniciales son seguidos por cianosis de la piel y mucosas, disnea y tos húmeda con esfuerzo; frecuentemente los cerdos tienen una tendencia al vómito.

El dolor respiratorio puede ser tan severo que los cerdos respiran con el hocico abierto en una posición sentada, poco antes de morir generalmente hay un drenado abundante de espuma sanguinolenta por el hocico y ollares. La muerte se presenta a las 24 horas después del inicio de los primeros signos, ocasionalmente un animal puede morir sin presentar los síntomas iniciales. La mortalidad en estos casos peragudos es alta (80 a 100%) (Nielsen 1985).

**Cuadro 2. Distribución de los serotipos por países, siendo los más virulentos los que aparecen subrayados. (Stephano y col. 1990).**

PAIS	SEROTIPO
Alemania Federal	2, 3, 4
Alemania Democrática	2, 3, 4, 5
Argentina	<u>1</u>
Austria	<u>1</u> , 7
Beigica	1, 3, 5, 7, <u>2</u>
Brasil	1, 3, 4, <u>5</u>
Canada	<u>1</u> , 2, 3, 4, 5, 6, 7
Corea	2, 3, 4, 5
Dinamarca	1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12
E. U. A.	<u>1</u> , 3, 4, <u>5</u> , 7
Finlandia	2, 5
Francia	3, <u>7</u> , <u>2</u>
Gran Bretaña	2, <u>3</u> , 5, 6, 7, 8, 9
Holanda	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Irlanda	8
Italia	1, 2, 3, 4
Japón	2, 3, 5
Rumania	5
Suecia	2, 3, 4, 8
Suiza	<u>2</u> , 3, 7, 9
Taiwan	5
Venezuela	7
Yugoslavia	<u>2</u> , 4

**SEROTIPOS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*  
RECUPERADOS DE CERDOS EN MEXICO**

Estado	No. de muestras	serotipos aislados										total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Jalisco	21	8	1	2	-	1	-	-	1	-	3	16
Michoacán	15	9	-	-	-	1	1	2	1	-	1	15
Guanajuato	13	10	-	-	1	1	-	-	-	-	1	13
Puebla	11	3	1	1	1	1	-	-	-	-	1	8
Edo. de Méx	9	4	-	-	-	2	-	-	-	-	-	6
Sonora	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Querétaro	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Yucatán	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
D.F.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Total</b>	<b>76</b>	<b>36</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>62</b>

Cuadro 3. Los datos presentados en esta tabla muestran la distribución de los diferentes serotipos en el país. Díaz y cols (1989)

En cerdos neonatos donde la enfermedad ocurre con frecuencia como una septicemia y la mayoría de la camada generalmente se pierde, las alteraciones nerviosas pueden ser una característica notable de la enfermedad en el grupo de esta edad (Nielsen 1985).

Otros cerdos pueden mostrar depresión y resistencia a moverse, cuando se forzan al movimiento los cerdos pueden mostrar signos de dolor respiratorio y una tos húmeda puede ser escuchada. La enfermedad puede progresar y terminar en la muerte en uno o dos días o puede transformarse en un estado crónico (Nielsen 1985).

Las afecciones crónicas en los animales no muestran signos característicos como una reducción de apetito, falta de crecimiento y tos crónica. La temperatura puede variar entre la normal y los 40-41° C. Los cerdos con lesiones crónicas son portadores de la bacteria y son un factor importante en la extensión de la infección en una piara. (Liggett, y col. 1986; Liggett y col. 1987).

### **3.2. Lesiones macroscópicas y microscópicas.**

#### **3.2.1. Lesiones macroscópicas.**

Las lesiones patológicas están generalmente confinadas al tórax y son características en casos agudos en que un diagnóstico presuntivo puede ser hecho sobre exámen post-mortem, en enfermedades peragudas la cavidad torácica contiene grandes cantidades de líquido serosanguinolento con pedazos de fibrina entre los pulmones y la pared torácica, los pulmones están muy duros con edema y congestión teniendo una apariencia púrpura oscuro. Hay consolidación extensiva en todos los lóbulos afectados, particularmente el aspecto dorsal de los lóbulos apicales y cardíacos y principalmente los lóbulos diafragmáticos, como distinción de la neumonía enzootica que principalmente afecta los lóbulos anteriores (Shiefer y cols 1974;

Didier y cols 1984; Liggett y cols. 1986; Liggett y cols. 1987; Freese 1990).

Los lóbulos consolidados están frecuentemente levantados sobre el tejido causando una elevación de la pleura, la pleuritis es diseminada especialmente sobre los lóbulos afectados. En casos crónicos la pleura puede ser desprendida en una placa delgada verde amarillenta. Los lóbulos pueden estar claramente delimitados por un edema extensivo y una fibrosis del tejido afectado, las lesiones iniciales revelan hemorragia y hepatización del tejido pulmonar y hay frecuentemente un centro necrótico verde amarillento del lóbulo afectado el cual puede ser circundado por un borde hiperemico, el cuerpo pulmonar tiene una consistencia friable y los nódulos linfáticos bronquiales están agrandados y congestionados. En los casos crónicos hay una pleuritis organizada con adherencias de fibrina en la pleura parietal haciendo difícil la remoción pulmonar de la cavidad torácica (Shiefer y cols 1974; Didier y cols. 1984; Liggett y cols. 1986; Liggett y cols 1987; Freese 1990).

Las lesiones neumónicas están delimitadas por fibrosis que pueden ser abscesos caseosos de más de 10 centímetros de diametro, particularmente en los lóbulos diafragmáticos. Una pericarditis generalmente acompaña a ésta pleuritis extensiva y pueden causar falla cardiaca, la cual está asociada con hepatomegalia y esplenomegalia. Los cerdos infectados que han sobrevivido a la enfermedad tienen pleuritis extensiva, pericarditis y hepatización lobular, particularmente en los lóbulos diafragmáticos. (Shiefer y cols. 1974; Didier y cols. 1984; Liggett y cols. 1986; Liggett y col. 1987; Freese 1990).

Las principales lesiones macroscópicas son las siguientes: Pericarditis, hidropericardio, hidrotórax de liquido sanguinolento,

hemorragia en miocardio, adherencias pleurales, infarto en los lóbulos pulmonares diafragmáticos y friabilidad de la zona infartada (Schultz 1985).

### 3.2.2. Lesiones microscópicas.

La lesión peraguda está caracterizada por congestión general con hemorragia y edema en el parenquima involucrado. El alveolo está lleno con líquido edematoso cargado de fibrina, eosinófilos y glóbulos rojos. Las bacterias cocobacilares individualmente o en pequeños grupos, están esparcidos al azar en el exudado y pueden ser observados por tinción de Giemsa. Pequeños grupos de células degenerativas de tipo indeterminado están dispersas en el fluido que llena el alveolo.

Frecuentemente es difícil distinguir las áreas de necrosis aguda acompañadas de hemorragia masiva de áreas viables adyacentes, las cuales están invadidas con edema hemorrágico. En las vías respiratorias hay degeneración vacuolar y ruptura de la mucosa epitelial generalmente acompañada de hemorragia y edema en las mucosas. En las lesiones agudas, subagudas y crónicas la fibrina y los glóbulos rojos lisados llenan los espacios alveolares dentro de la lesión. Por medio del examen macroscópico del tejido seccionado hay una mejor apreciación (Little 1971; Didier y cols. 1984; Schultz 1985; Liggett y cols 1986).

En los alveolos hay infiltración de células mononucleares como son linfocitos y macrófagos. Estas células mononucleares pueden dar origen a células polimorfonucleares, células similares infiltran el tejido intersticial adyacente mezcladas con fibrina y glóbulos rojos en trombos en los vasos sanguíneos y linfáticos e infiltran la adventicia, músculo e intima de los vasos pulmonares. Con el tiempo el

exudado celular de la lesión se vuelve más abundante y más claramente neutrofilico en los límites del tejido necrotizado. La fibrosis se extiende desde el tejido adyacente de la pleura viable a la adventicia perivascular y peribronquial y de la división alveolar e interlobular en la cual la fibrosis es abundante. Conforme la fibrosis madura hay poca o ninguna acumulación de leucocitos mononucleares (Little 1971; Didier y cols. 1984; Schultz 1985; Liggett y cols. 1986).

Los principales hallazgos histopatológicos durante los casos de PCP se pueden resumir en los siguientes puntos:

Zona de infarto, edema vascular, infiltración peribronquial y perivascular de células mononucleares linfocitos y macrófagos y hemorragia en alveolos (Little 1971; Didier y cols. 1984; Schultz 1985; Ligget y cols. 1986)

### 3.3. Diagnóstico bacteriológico.

El diagnóstico bacteriológico para determinar las infecciones por Actinobacillus pleuropneumoniae es difícil ya que los métodos de cultivo de rutina no proporcionan resultados satisfactorios cuando se toman muestras de animales infectados crónicamente los aislamientos no siempre son exitosos.

Otro problema que se presenta en casos crónicos o animales portadores, es que se emplea tejido pulmonar para intentar el aislamiento de Actinobacillus pleuropneumoniae; Wilson y cols (1987) realizaron un estudio en el cual aparte del tejido pulmonar, utilizaron otros tejidos no considerados de rutina para el aislamiento de Actinobacillus pleuropneumoniae, los tejidos que ellos emplearon fueron mucosa nasal anterior, cornetes posteriores, tonsilas faringeadas, tráquea, bronquios pulmonares, nódulos linfoides y bazo y aislaron A. pleuropneumoniae por lo menos de uno de los tejidos

empleados como muestra.

PiJoan y cols (1983) han desarrollado una técnica de aislamiento por diluciones para favorecer el crecimiento de Actinobacillus pleuropneumoniae y disminuir la contaminación por otros microorganismos como es P. multocida. Esta técnica se desarrolla de la siguiente manera. El pulmón a trabajar se esteriliza por la parte exterior con una espátula al rojo vivo posteriormente se toma un gramo de tejido pulmonar y se coloca en un tubo con medio de cultivo líquido complementado con factor V y se agita vigorosamente, de este tubo se realizan diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$  se incuban por 12 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y de la dilución más alta que presente desarrollo bacteriano se siembra en agar sangre con cepa nodriza. Esta técnica ha dado resultados satisfactorios para el aislamiento de Actinobacillus pleuropneumoniae.

Dentro de las dificultades que se presentan para el aislamiento de Actinobacillus pleuropneumoniae es el contar con un medio adecuado para el primoaislamiento. En este aspecto Gilbride y cols (1983) han desarrollado un medio selectivo para el aislamiento de Actinobacillus pleuropneumoniae, el cual contiene inhibidores de otros microorganismos.

El envío adecuado de las muestras es importante para tener un resultado confiable. Wilson y cols. (1987) estudiaron la viabilidad de Actinobacillus pleuropneumoniae bajo diferentes condiciones de almacenamiento consideraron cuatro condiciones de preservación: a 20; a 4; a  $-6$  y a  $-20^{\circ}\text{C}$  y observaron que cuando las muestras eran almacenadas a 4 y  $20^{\circ}\text{C}$  solo recuperaban Actinobacillus pleuropneumoniae en medios selectivos por lo que un buen manejo de las muestras empleadas para el diagnóstico bacteriológico es importante para proporcionar un resultado adecuado.

### 3.4. Diagnóstico serológico.

Las pruebas serológicas desempeñan un papel importante para controlar la diseminación de Actinobacillus pleuropneumoniae debido a que los animales portadores sanos son de importancia en la transmisión de la enfermedad entre hatos (Nielsen y col. 1977).

La importancia de las pruebas serológicas se subraya adicionalmente, por la falta de una vacuna que evite la infección confiablemente (Fedorka y cols. 1990).

El diagnóstico definitivo de la PCP debe ser oportuno y rápido y es esencial identificar los diferentes serotipos prevalentes en el país para así elaborar los biológicos adecuados para el diagnóstico y la inmunización en animales. El método serológico es el más adecuado ya que se puede realizar en los animales vivos con o sin signos clínicos, no requiere del sacrificio de los cerdos, es más rápido y nos permite hacer perfiles de la enfermedad identificando el punto de infección en la granja. Para el diagnóstico serológico de PCP se describen brevemente las pruebas serológicas más empleadas.

#### 3.4.1. Prueba de fijación de complemento.

La prueba de Fijación de Complemento es el método de rutina más usado para el serodiagnóstico de infecciones por Actinobacillus pleuropneumoniae (Nielsen 1974; Kume y cols 1984; Nakai y cols 1985; Rapp y cols 1985).

Esta prueba se realiza preparando el antígeno en PPLO caldo cultivado por 6 horas a 37°C e inactivado con merthiolate. Los sueros se diluyen en placas de microtitulación donde se adiciona el antisuero más el antígeno de Actinobacillus 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 1500 rpm durante 5 minutos. La reacción se puede ver por medio del porcentaje de hemólisis producida, dándose como negativos los que tengan una hemólisis mayor del 30% y como positivos los que tengan una hemólisis menor del 30% (Lombin y cols. 1982; Schultz y cols. 1982; Píjoan 1985).

Por medio de esta técnica la IgM es inactivada en el suero cuando se calienta a 60°C siendo este paso obligatorio en todas las técnicas de fijación de complemento el cual solo es fijado por la IgG. (Sutherland 1980).

Una de las mayores dificultades asociadas con esta prueba es su relativa insensibilidad que puede dar ocasionalmente falsos positivos y falsos negativos (Lombin y cols. 1982; Rapp y cols. 1985 ). Además, no diferencia a los animales infectados de los recientemente vacunados y esta sujeta a una gran variabilidad en los resultados (Sutherland 1980).

Dentro de los problemas técnicos para montar esta prueba se encuentra la actividad anticomplementaria y procomplementaria presente en los sueros de los cerdos. (Sutherland 1980; Mittal y cols. 1984). Con esta técnica se puede detectar a los portadores sanos sin que estos desarrollen una lesión pulmonar y el cultivo bacteriológico sea negativo.

#### **3.4.2. Prueba de ELISA.**

El principio de esta prueba es la utilización de la enzima peroxidasa, junto con un suero específico que puede ser de cabra o de conejo con anticuerpos de cerdo.

El antígeno es preparado en caldos de cultivo que son lavados, filtrados y el sobrenadante es utilizado como antígeno, al cual se le

agrega 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 observa la reacción por medio de la coloración a negro si es positivo. (PiJoan 1985). Esta prueba detecta anticuerpos de la clase IgG (Rousseau y cols. 1988).

Para esta técnica se han elaborado diferentes métodos de extracción como son: el calor, fenol, detergentes como tween 20, sin embargo, ninguno de estos extractos a podido eliminar las reacciones cruzadas que se presentan entre los diferentes serotipos que posee Actinobacillus pleuropneumoniae (Nicolett y cols. 1981), y por otro lado con las reacciones cruzadas que se presentan con Actinobacillus suis (PiJoan 1985; Bossé 1990).

Dentro de las ventajas de ELISA es su alta sensibilidad ya que es posible detectar más reactores positivos en una piara infectada. (Nicolet y cols. 1981).

#### 3.4.3. Prueba de aglutinación.

La prueba de aglutinación a sido usada comunmente para la serotipificación de cepas de Actinobacillus pleuropneumoniae, hay dos variaciones que son en tubo y en placa bajo el mismo principio. (Gunnarson y cols. 1977).

##### 3.4.3.1. Prueba de aglutinación en tubo.

Para la prueba de aglutinación en tubo el antígeno se prepara en solución salina fisiológica a una concentración estandar para cada antígeno, los sueros a probar se inactivan a  $56^{\circ}C$  durante 30 minutos para eliminar la actividad del complemento, posteriormente se preparan diluciones del suero y se colocan en tubos de ensayo con solución salina fenolada en volúmen a volúmen antígeno/suero; se incuba a  $56^{\circ}C$

durante 1 hora seguida de una incubación a 37°C de 24 a 48 horas (Mittal y cols. 1984).

Yamamoto y Ogata (1980) reportaron que en esta prueba utilizando antígeno formalinado es un método simple y útil para el serodiagnóstico en cerdos infectados con Actinobacillus pleuropneumoniae mediante la prueba de aglutinación en tubo.

#### 3.4.3.2. Prueba de 2-Mercaptoetanol.

La prueba se basa en la presencia del 2-mercaptoetanol, el cual destruye selectivamente a la IgM detectando solo IgG en el suero a probar mejorando la especificidad de los anticuerpos.

En esta prueba el suero sospechoso es diluido en solución salina formalinizada a la cual se le adiciona 2-mercaptoetanol en una concentración de 0.15 M. La mezcla antígeno-anticuerpo es incubada toda la noche a 37°C, el antígeno se prepara a partir de un cultivo de 18 horas y calentado a 56°C por una hora y la reacción de aglutinación es leída en base a los grumos y la claridad del sobrenadante (Mittal y cols. 1984).

Esta prueba es altamente específica y más sensible que otras pruebas de serotipificación, además, se puede hacer en lechones de pocas semanas de edad (Mittal y cols. 1984; Pijoan, 1985).

#### 3.2.3.3. Prueba de aglutinación con partículas de látex.

Esta es una reacción de aglutinación en la cual las partículas de látex son usadas para absorber pasivamente las proteínas solubles y los antígenos polisacáridos.

Para realizar esta prueba los organismos son cosechados y lavados 3 veces en solución salina buffer de fosfatos (PBS) a un pH de 7.2 por sedimentación las células se centrifugan a 7000 g por 30 minutos. El

depósito es suspendido en PBS a una concentración de  $10^{10}$  cel/ml y tratada con un sonicador a 10 kc/s a 50 W por 25 minutos. La suspensión es centrifugada a 11000 g por 30 minutos. El sobrenadante resultante es decantado y usado como antígeno (Mitul y cols. 1981).

Este antígeno es mezclado con un volumen igual de 1% de suspensión de partículas de látex en solución salina buffer de glicina a un pH de 8.2 la mezcla es dejada y puesta a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas, la superficie de las partículas de látex son cubiertas con antígeno. El suero es inactivado a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Dentro de cada pozo de las placas de microtitulación se coloca 0.025 ml de PBS y 0.025 ml de suero a probar es agregado dentro del primer pozo, haciéndose diluciones seriadas de suero. Cada pozo recibe 0.025 ml de la suspensión de antígeno cubierto con partículas de látex (Mitul y cols 1981).

Después de terminada la mezcla las placas son selladas con una cinta plástica e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ . La reacción es leída después de 18 horas. Títulos de aglutinación con una dilución de 1:8 o más son considerados positivos (Mitul y cols. 1981)

Dentro de las ventajas para el uso de esta prueba es que es simple y útil para los estudios serológicos sobre las infecciones de Haemophilus; especialmente cuando hay un gran número de muestras, también es muy útil para detectar los anticuerpos mucho más pronto que otras pruebas (Mitul y cols.1981).

Por otra parte como desventajas se observan reacciones cruzadas entre los serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae y algunas especies de Haemophilus, además de que puede dar falsos positivos (Mittal 1983).

#### 3.4.3.4. Prueba de hemaglutinación indirecta.

Esta prueba determina anticuerpos específicos contra un antígeno que se encuentra adsorbido en eritrocitos de carnero.

Sangre de carnero es colectada en un volumen igual de Alsever's y son lavados tres veces en solución buffer. Un cultivo de Actinobacillus pleuropneumoniae se usa como fuente de antígeno el cual está suspendido en buffer de fosfatos y rotas en una prensa francesa, el cultivo roto es centrifugado y el sobrenadante es la fuente de antígeno. El recubrimiento de los eritrocitos es incubando a 37°C por una hora la concentración óptima de antígeno y eritrocitos, después del recubrimiento los glóbulos rojos son lavados tres veces en buffer de fosfatos y ajustados a una concentración del 1%. Los sueros son inactivados a 56°C por 30 minutos, la prueba se hace en placas de microtitulación con fondos en 'U' en los cuales se deposita 0.05 ml. de suspensión celular. Las placas se dejan reposar por 2 horas. El título se determina como la dilución más alta de suero en la cual se observa claramente la formación de la malla (Nielsen 1974).

Dentro de las ventajas de esta prueba es que es sencilla y rápida de realizarse pero se han observado reacciones inespecíficas comparadas con las que se presentan en fijación de complemento, además de que la absorción del antígeno en los eritrocitos puede no ser homogéneo. (Nielsen 1974).

#### 3.4.3.5. Prueba de aglutinación en placa.

En la prueba de aglutinación en placa se hacen diluciones de antígenos de 6-7 horas de cultivo en solución salina formalizada del 0.1%, se confrontan con los diferentes sueros, presentándose la reacción de aglutinación cuando son positivos aproximadamente después de los 30 segundos, apreciándose mejor a los 3 minutos de haberse

confrontado (Gunnarson y cols. 1977).

Allan y cols. (1976) han demostrado que la prueba de aglutinación detecta IgM más eficientemente que IgG.

Estas pruebas son rápidas de realizarse pero presentan la desventaja que no se pueden usar con cepas que son autoaglutinables, no aglutinables o poliaglutinables, por otro lado se han observado reacciones cruzadas entre los diferentes serotipos (Hommez 1990). Además ambas pruebas son relativamente insensibles, obteniendo bajos títulos con animales que se sabe son positivos (Pi Joan 1985).

#### 3.4.4. Prueba de precipitación.

Esta prueba se ha desarrollado con dos variantes que son en tubo y en placa.

##### 3.4.4.1. Prueba de precipitación en tubo.

Esta prueba se lleva a cabo con cultivos de 18 horas se prepara una suspensión en solución salina formalizada, se centrifuga y el sobrenadante se utiliza como antígeno; se corre en pipetas pasteur donde se pone con su antisuero monoespecífico, se sella la pipeta y a los pocos minutos aparece claramente una línea de precipitación cuando es positivo. (Pi Joan 1985; Hommez 1990).

Esta prueba no se utiliza para la detección de anticuerpos en los cerdos infectados por ser de baja sensibilidad. (Pi Joan 1985).

##### 3.4.4.2. Prueba de precipitación en placa.

Para la técnica de precipitación en placa se utiliza una suspensión de bacterias la cual se calienta por 10 a 60 minutos a 100°C y se centrifuga, el sobrenadante es lo que se usa como antígeno.

Para esta prueba se coloca una gota del antígeno y una gota del suero a probar sobre una placa de vidrio y se mezcla. La lectura se realiza después de 1 a 3 minutos, siendo positivo cualquier grado de

precipitación y negativos aquellos en los que no se presente. Una de las ventajas es que es una prueba rápida de hacer una vez que se tienen los antígenos preparados y los resultados se obtienen en muy poco tiempo. La desventaja es que se pueden presentar reacciones cruzadas entre serotipos si los antígenos no son absorbidos previamente. (Hommez 1990).

#### 3.4.5. Prueba de coagulación.

Se basa en la reacción antígeno-anticuerpo específica y la fracción Fc del anticuerpo con la proteína 'A' de Staphylococcus aureus cepa Cowan I (Mittal 1985).

Para la realización de esta técnica se toma una pieza pequeña del tejido pulmonar afectado de aproximadamente 2 gramos, se tritura en 3 ml de solución salina en un mortero, la suspensión del tejido pulmonar se conserva en un tubo pequeño de vidrio el cual es hervido en baño maria por 5 minutos y después se centrifuga a 8000 rpm por 30 minutos y el sobrenadante es utilizado como antígeno. El suero es primeramente reactivado con cultivo de Staphylococcus aureus, Cowan I (con producción abundante de proteína A en donde se pega el anticuerpo por medio de la fracción del complemento, para que quede expuesto el sitio activo); la suspensión de Staphylococcus-anticuerpo 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-anticuerpo son confrontados con el antígeno del Actinobacillus, y es positivo si la reacción de aglutinación se presenta antes de los 4 minutos (Mittal y cols 1985; Hunter 1986; Hoffman 1989).

Una clara ventaja de esta prueba es que puede detectar antígenos directamente de muestras de pulmón sin importar el estado de

conservación de la muestra. (Mittal y cols. 1983; Hunter 1986; Hoffman 1989).

Dentro de los inconvenientes de esta prueba es que se requiere del sacrificio de un número significativo de animales para determinar el grado de infección de una granja, también se requiere contar con antisueros específicos para cada serotipo para establecer los serotipos prevalentes en la granja. Además con esta técnica no se pueden detectar anticuerpos ya que la reactividad de la proteína A es inespecífica a la Fc de las otras gamaglobulinas.

#### 3.4.6. Prueba de inhibición de la hemólisis.

La prueba detecta la presencia de anticuerpos específicos que son capaces de bloquear la actividad hemolítica de las proteínas (hemolisinas) extracelulares de Actinobacillus pleuropneumoniae.

Para la realización de esta prueba se hace un cultivo líquido de 24 horas con colonias de Actinobacillus pleuropneumoniae con actividad hemolítica, posteriormente en tubos de ensayo en los cuales se tiene un volumen de suero problema se añade al primer tubo 1 ml del cultivo y se hacen diluciones seriadas, después en una caja de agar sangre con una concentración del 1% de eritrocitos de carnero se subdivide y en cada división se siembra una gota de la dilución de cada tubo y se incuba toda la noche a 37°C. Los resultados de esta prueba se interpretan como positivos cuando no se forma el halo de hemólisis y negativo cuando sí se forma (Pljean y cols. 1991).

Kamp y col. (1991) han demostrado que no todos los serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae presentan la misma actividad hemolítica lo que implica un problema cuando los animales están infectados con los serotipos de baja actividad hemolítica traduciéndose esto en una disminución en la producción de anticuerpos

en contra de la proteína hemolítica que no serían detectadas fácilmente por medio de esta prueba.

Otro de los aspectos fundamentales para esta prueba es el contar con una cepa estándar que tenga una actividad hemolítica ya que este es un factor determinante para evaluar la presencia de anticuerpos inhibidores de la actividad de la hemolisina que produzca la cepa de referencia.

#### 3.4.7. Prueba de inmunotransferencia.

Esta prueba detecta anticuerpos específicos contra antígenos específicos de Actinobacillus pleuropneumoniae.

Los componentes de la membrana externa son separados por SDS PAGE y transferidos electroforéticamente a un filtro de nitrocelulosa, el cual se corta en tiras, éstas tiras son bloqueadas para eliminar adherencia inespecífica de los anticuerpos. Los sueros a probar se incuban con las tiras previamente bloqueadas, después se lava y se incuban con anti IgG de cerdo marcado con peroxidasa elaborada en conejo. Posteriormente se lava nuevamente y se adiciona el sustrato de la enzima peroxidasa desarrollando una coloración visible.

Una desventaja de esta prueba es que no detecta adecuadamente todos los antígenos presentes en la muestra, ya que para la elaboración del antígeno se requiere dar tratamiento previo lo que desnaturaliza parcial o totalmente a algunos antígenos. (Chiang 1991).

#### 3.4.8. Prueba de radioinmunoensayo (RIA).

Esta prueba se basa en la competencia de los anticuerpos por unirse a un antígeno marcado radioactivamente y a un antígeno sin marcar.

En esta técnica se prepara el antígeno marcado radioactivamente y

se combina con el anticuerpo, se van adicionando cantidades conocidas de antígeno sin marcar las cuales compiten selectivamente por los sitios receptores. Posteriormente se separa el complejo antígeno marcado-anticuerpo del antígeno marcado libre por técnicas de electroforesis, cromatografía, etc. y la cantidad de antígeno marcado fijado a diferentes concentraciones puede utilizarse para construir una curva que permita conocer la concentración del antígeno sin marcar que se desconozca. Los marcadores radioactivos que se utilizan más comunmente para esta técnica son tritio ( $H^3$ ), yodo 125 ( $I^{125}$ ) y yodo 135 ( $I^{135}$ ) (Inzana 1987; Stites y cols. 1983). La lectura de esta prueba se realiza en un contador de centelleo.

Dentro de las ventajas de esta prueba es que se puede cuantificar cantidades pequeñas de antígeno del orden de los picogramos ( $10^{-12}$ g), además, tiene gran sensibilidad y especificidad. Es útil para detectar sustancias que se comporten como un antígeno o como un hapteno. Por otro lado la separación puede efectuarse por medios fisicoquímicos e inmunológicos (método de doble anticuerpo) prefiriéndose este método en la mayoría de los laboratorios.

Uno de los inconvenientes es el riesgo potencial de la radiación y de la eliminación de desechos radioactivos, también el costo elevado del método y la gran cantidad requerida del segundo anticuerpo.

#### 4. Antecedentes del PLEUROTTEST (marca registrada por la UNAM)

La situación del diagnóstico de la PCP en países como México y en los demás de Latinoamérica, se limita solo a eso, al diagnóstico y no a la evaluación del status inmune de la granja y prevención y control de la enfermedad.

Para la identificación de la PCP se emplean los siguientes métodos:

- a) Observación de los signos clínicos en el cerdo y en los de la zehurda.
- b) Observación de las lesiones a la necropsia de los animales muertos de casos hiperagudos y agudos o durante la inspección en los centros de abasto de los casos crónicos.
- c) Aislamiento y tipificación de Actinobacillus pleuropneumoniae a partir de los pulmones de cerdo con problemas agudos o crónicos.

El diagnóstico serológico que es útil para el control y erradicación de la enfermedad no se lleva a cabo, debido principalmente a la falta de costosa infraestructura como son los laboratorios equipados y los recursos humanos capacitados.

PLEUROTTEST consiste en un método rápido que no requiere equipo de laboratorio, se realiza en unos cuantos minutos y solo requiere de unos pocos ml. de suero del animal a estudiar, por lo tanto no se necesita de personal calificado. El método rápido es un ensayo de diagnóstico serológico por medio de una prueba de aglutinación directa en placa que ofrece la única oportunidad de distinguir directamente en la propia granja porcícola si un cerdo ha sido infectado con Actinobacillus pleuropneumoniae de campo y por lo tanto es portador de la pleuroneumonía contagiosa porcina o si el cerdo está sano esté o no vacunado contra la PCP.

PLEUROTTEST es una prueba de aglutinación en placa destinada para identificar directamente los anticuerpos capsulares de Actinobacillus pleuropneumoniae contenidos en el suero del cerdo de cualquier edad.

#### 4.1. Explicación de la prueba.

Los cerdos cuando se infectan con Actinobacillus pleuropneumoniae desarrollan la pleuroneumonía contagiosa porcina, estos animales mueren o llegan a recuperarse. En los pulmones de los cerdos que llegan a sobrevivir perduran las lesiones crónicas o 'secuestros' que permanecen durante toda la vida del animal y se consideran estos como portadores asintomáticos. Si un cerdo sufre de la PCP y es un portador asintomático produce anticuerpos propios de la enfermedad. Por el contrario, si un cerdo es vacunado contra la PCP y no ha estado en contacto con Actinobacillus pleuropneumoniae desarrollan una clase de anticuerpos propios de la vacunación.

PLEUROTTEST es un equipo diseñado para detectar anticuerpos producidos por los cerdos enfermos de PCP, mediante un simple ensayo de aglutinación en placa que determina en unos minutos si un cerdo tiene anticuerpos contra Actinobacillus pleuropneumoniae.

PLEUROTTEST es una prueba serológica que no requiere equipo de laboratorio. Se realiza en unos cuantos minutos y la toma de muestra es fácil de realizar, por lo tanto no necesita de personal calificado.

El método rápido es un ensayo de diagnóstico serológico por medio de una prueba de aglutinación directa en placa que ofrece la única oportunidad de distinguir directamente en la granja porcícola si un cerdo ha sido infectado con Actinobacillus pleuropneumoniae de campo o ha sido vacunado contra la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP).

PLEUROTTEST es una prueba de aglutinación en placa (PAP) destinada a identificar directamente los anticuerpos capsulares de

Actinobacillus pleuropneumoniae a partir de sueros de cerdo de cualquier edad. PLEUROTTEST está diseñado para diagnóstico in vitro.

#### 4.2. Principios del procedimiento.

La prueba de PLEUROTTEST se basa en el principio de aglutinación directa. El suero de cerdo para probar es mezclado con el reactivo que contiene células completas de Actinobacillus pleuropneumoniae teñido.

En el caso de un cerdo infectado con PCP el suero contiene anticuerpos específicos que reaccionan con los antígenos presentes en el reactivo produciendo una aglutinación, caracterizada por la aparición de grumos en la mezcla, indicando un resultado positivo. Si se tratara de un cerdo sano, el suero normalmente no contiene anticuerpos contra Actinobacillus pleuropneumoniae o si se tratara de un cerdo vacunado contra PCP, el suero contiene otra clase de anticuerpos que no reacciona con el reactivo, de tal forma que la aglutinación no se produce y no se observan grumos indicando un resultado negativo.

La prueba de PLEUROTTEST se efectúa en un máximo de 10 minutos. La prueba podrá ser realizada por personal sin conocimientos técnicos mediante los siguientes pasos:

- a) El frasco con el reactivo se deja equilibrar a la temperatura ambiente (12 a 25°C) durante 10 a 15 minutos.
- b) Utilizando una pipeta aplicadora se coloca una gota del suero que se va a analizar en cada una de las cuatro celdas en la línea asignada a cada cerdo en la placa.
- c) Se coloca una gota del reactivo de aglutinación del serotipo a identificar en la celda que contiene la gota del suero y se mezclan con un movimiento rotatorio utilizando un palillo mezclador para cada celda.

d) Se agita la placa suavemente con movimiento ondulatorio durante 4 minutos y se efectúa la lectura.

La reacción de aglutinación es muy estable pero se recomienda que las lecturas se lleven a cabo dentro de los dos minutos después de finalizada la prueba.

Los sueros de los cerdos infectados con Actinobacillus pleuropneumoniae de campo, mostrarán fuerte aglutinación mientras que los sueros de los cerdos sanos y los vacunados contra la PCP permanecerán sin grumos.

#### 4.3. Aportación del PLEUROTTEST a la porcicultura.

PLEUROTTEST fue conceptualizado como una prueba tamiz para detectar animales enfermos de PCP directamente en granjas, aun por personal no entrenado en las técnicas de diagnóstico serológico. PLEUROTTEST tiene la enorme ventaja de no dar falsos reactores negativos. Los reactores positivos podrán ser reevaluados mediante otras pruebas ya sean serológicas o no.

Los resultados obtenidos mediante PLEUROTTEST ayudarán al Médico Veterinario de la granja a tomar las medidas adecuadas para el control y la erradicación de la PCP.

## 5. OBJETIVOS

Evaluar y validar la prueba de aglutinación en placa denominada PLEUROTTEST a base de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1 correlacionando ésta con las lesiones y los aislamientos de los agentes involucrados en las neumonías.

Relacionar lesiones, aislamiento del agente con los resultados obtenidos en la prueba de aglutinación en placa PLEUROTTEST y la de 2-Mercaptoetanol y aglutinación en tubo.

Diagnosticar a los animales afectados por pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP) a nivel de rastro y campo mediante una prueba rápida y fácil de manejar sin requerimiento de equipo ni personal especializado.

## 6. MATERIAL Y METODO

### Muestreo.

Se efectuaron visitas semanales al rastro de Ferrería con el objeto de coleccionar muestras de pulmones y sueros al azar, además, de sueros provenientes de una granja del estado de Jalisco.

Para la recolección de muestras se arretaron a 378 animales al azar coleccionando sus sueros al momento del sacrificio y a los cuales se les fue siguiendo por la línea de matanza hasta el momento de la evisceración en donde se les tomo una muestra de tejido pulmonar. Los pulmones se clasificaron de acuerdo a las lesiones macroscópicas que presentaron en 4 grupos que se designaron de la siguiente manera: Consolidación gris-rojiza (CGR), consolidación fibrino hemorrágica (CHF), consolidación gris (CR) y sin cambios patológicos aparentes (SCPA).

Por otro lado de la granja del estado de Jalisco con problemas de pleuroneumonía contagiosa porcina se coleccionaron 93 sueros de vientres y sementales, además de 20 pulmones con lesiones típicas de pleuropneumonía contagiosa porcina.

### Cultivos.

Para el aislamiento de Actinobacillus pleuropneumoniae se procedió a quemar la superficie del pulmón con una espátula al rojo vivo, posteriormente se hizo una insición con tijeras estériles y con una asa se tomo una muestra del pulmón la cual se estrió sobre agar infusión cerebro corazón (BHI) complementado con 5% de sangre de bovino. El factor V, nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) fue proporcionado in situ mediante la técnica de estria cruzada con una cepa de Staphylococcus aureus Cowan I para observar tanto la

dependencia a este factor como el fenómeno de Christie, Atkins y Much-Petersen (CAMP).

Las cajas se incubaron a 37°C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Las colonias sospechosas de Actinobacillus pleuropneumoniae y Pasteurella multocida se separaban y propagaban en agar RHI suplementado con extracto de levadura al 5% volumen a volumen para su posterior caracterización bioquímica.

Para Actinobacillus pleuropneumoniae se le realizó las siguientes pruebas bioquímicas: Pruebas primarias (Catalasa, Oxidasa, Motilidad, Gram, O-F) y pruebas de fermentación de carbohidratos (Trehalosa, Rafinosa, Fructuosa, Manosa, Manitol, Dextrosa).

#### Serología.

Prueba de aglutinación en placa. Esta prueba se realizó utilizando el PLEUROTTEST, en la que el antígeno es preparado, adecuado y estandarizado con Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1, la cual consistió en colocar sobre una placa de vidrio previamente cuadrículada una gota (0.03 ml.) de suero problema con ayuda de una pipeta y una gota de antígeno (0.03 ml.) los cuales se mezclaron con un palillo de madera hasta homogenizar la mezcla; posteriormente la placa se agitó suavemente con movimientos ondulatorios durante 4 minutos después de los cuales se realizó la lectura siendo positivo cualquier grado de aglutinación. Esta reacción de aglutinación es estable pero se recomienda que las lecturas se realicen dentro de los 2 minutos después de finalizada la prueba.

Prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol. La cepa de Actinobacillus pleuropneumoniae se cultivó en medio de infusión cerebro corazón suplementado con 5% de extracto fresco de levadura

Incubándose a 37°C por 18 horas, el cultivo se cosechó con solución salina fisiológica al 0.85% calentándose a 56°C por una hora, posteriormente se lavaron las células con solución salina fisiológica y fue ajustada a una concentración de 0.09%.

Los sueros se inactivaron por calor a 56°C por 30 minutos y se hicieron diluciones seriadas de 1:25 hasta 1:400 con pipeta de bang. Se les adicionó 1 ml de solución de 2-mercaptoetanol (0.715 de 2-mercaptoetanol en 100 ml. de solución salina fisiológica) incubándose por 30 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se le adicionó 1 ml. del antígeno y se incubó toda la noche a 37°C (Mittal y cols. 1984).

La lectura de los resultados se realizó en base al título de la dilución de suero que dió el último sobrenadante claro y la formación de grumos firmes en el fondo del tubo.

Prueba de Aglutinación en tubo. Para esta prueba se procedió de la misma manera que para la prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol con la variante de que fue ajustada a una concentración de 0.045% y el antígeno fue suspendido en solución salina fisiológica conteniendo fenol al 0.5%, haciéndose las mismas diluciones de 1:25 a 1:400 y adicionando 2 ml. del antígeno en lugar de la solución de 2-mercaptoetanol (Mittal y cols. 1984).

## 7. RESULTADOS

Durante el período comprendido de 6 meses se colectaron 293 pulmones en donde el 18.4 % presentaron áreas de consolidación gris el 21.8 % fueron de tipo fibrino hemorrágica 29.3 % presentaron áreas de consolidación rojiza; y finalmente el 28.7 % de los pulmones no presentaron cambios patológicos aparentes. Solo el 1.8 % de los pulmones además de presentar lesiones fibrinohemorrágicas tuvieron áreas con focos necróticos (sequestros) (Cuadro 4).

En cuanto a los aislamientos de las lesiones CGR se encontró el 48.0% de Actinobacillus pleuropneumoniae de los cuales el 12.9% pertenecieron a la biovariedad 1, el 35.1% a la biovariedad 2; el 51.8% a Pasteurella multocida y el 0.2% a bacterias no determinadas. De lesiones CFH se encontró el 57.8% de Actinobacillus pleuropneumoniae del cual el 15.6% perteneció a la biovariedad 1, y el 42.1% a la biovariedad 2; y el 34.4% a Pasteurella multocida y el 7.9% a bacterias no determinadas. De las lesiones CG se encontró el 55.8% de Actinobacillus pleuropneumoniae del cual 15.1% perteneció a la biovariedad 1, y el 40.7% a la biovariedad 2; el 41.9% a Pasteurella multocida y el 2.3% a bacterias no determinadas. Por último en los pulmones SCPA se encontró el 41.6% de Actinobacillus pleuropneumoniae del cual el 8.3% perteneció a la biovariedad 1, y el 33.3% a la biovariedad 2; el 22.6% a Pasteurella multocida y el 35.8% a bacterias no determinadas (Cuadro 5).

De las lesiones típicas de PCP como fueron las tipo consolidación fibrino hemorrágica se encontró que el 14.5% correspondieron a aislamientos positivos de Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1, mientras que el 85.5% fueron negativos o se aislaron otros agentes.

De las lesiones crónicas (secuestros) de PCP se aisló en 1.2% Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 y 0.6% de Pasteurella multocida.

Además se aisló el Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 de lesiones tipo consolidación gris-rojiza que no correspondieron a las encontradas en PCP, en tanto el 87.1% fueron negativos o se aislaron otros agentes, así mismo se encontró un 15.1% de aislamientos de Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 en pulmones con lesiones tipo consolidación gris, mientras que el 84.9% fueron negativos o se aislaron otros agentes; pero también se encontró que de pulmones sin cambios patológicos aparentes se aisló el Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 en 8.3%, en tanto el 91.7% fueron negativos o se aislaron otros agentes (Cuadro 5).

Los aislamientos de Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 correspondieron a los serotipos 1,3,5 y 7, no se encontraron éstos en un solo pulmón, sino que se aislaron en muchos pulmones.

En el cuadro 6 se resumen los hallazgos obtenidos con la prueba serológica PLEUROTTEST, aislamientos y lesiones y se encontró que en el 27.3% la prueba serológica y el aislamiento fueron negativos; así mismo se encontró que en el 15.4% la prueba serológica fue negativa y se aisló Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2; también cuando la prueba serológica PLEUROTTEST salió negativa se aisló Pasteurella multocida en 13.0% de los casos; así mismo se encontró que con PLEUROTTEST negativo en el 11.0% se aisló Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2 y Pasteurella multocida y en el 3.4% de los casos negativos a PLEUROTTEST se aisló Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1.

**Cuadro 4. Relación de los pulmones colectados en el rastro con diferentes lesiones.**

<b>Lesiones en pulmones colectados</b>	<b>Número</b>	<b>%</b>
<b>Consolidación gris - rojiza</b>	<b>54</b>	<b>18.4</b>
<b>Consolidación fibrino-hemorrágica</b>	<b>64</b>	<b>21.8</b>
<b>Consolidación gris</b>	<b>86</b>	<b>29.3</b>
<b>Sin cambios patológicos aparentes</b>	<b>84</b>	<b>28.7</b>
<b>Secuestros</b>	<b>5</b>	<b>1.8</b>

Cuadro 5. Se muestran los aislamientos obtenidos de los pulmones con los diferentes tipos de lesiones.

Aislamiento	Tipo de lesión				Total
	CGR	CFH	CG	SCPA	
Negativo	13	27	25	39	104
AP <sub>1</sub>	3	4	6	2	15
AP <sub>2</sub>	8	14	16	20	58
AP <sub>1,2</sub>	0	2	3	2	7
AP <sub>1</sub> - Past.	2	3	3	3	11
AP <sub>2</sub> - Past.	9	10	15	7	41
AP <sub>1,2</sub> Past.	2	1	1	0	4
Past.	17	8	17	11	53

CGR = Consolidación gris-rojiza.

CFH = Consolidación fibrino hemorrágica.

CG = Consolidación gris.

SCPA = Sin cambios patológicos aparentes

AP<sub>1</sub> = Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1

AP<sub>2</sub> = Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2

Past. = Pasteurella multocida.

En cuanto a los resultados positivos a PLEUROTTEST en el 8.1% no se aisló el agente; en el 5.1% se aisló Pasteurella multocida; así mismo se encontró que en el 4.4% se aisló Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2. Por otra parte se obtuvieron aislamientos de Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1, biovariedad 2 y Pasteurella multocida en menor porcentaje (Cuadro 6).

Por otra parte la prueba serológica PLEUROTTEST detectó el 27.5% de reactivos positivos de pulmones con lesiones tipo consolidación fibrino hemorrágica en donde en ocasiones se aislaba el Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 y en otras se encontraba mezclado con Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2 y Pasteurella multocida o bien no se aislaba ningún agente; así mismo se encontró que la prueba serológica no identificó al 72.5% de los casos con lesiones tipo consolidación fibrino hemorrágica típicas de PCP.

Con respecto a las lesiones de consolidación gris-rojiza PLEUROTTEST detectó el 31.5% de reactivos positivos en donde si bien se aisló el Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 en otros se encontró en combinación con Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2 y Pasteurella multocida o bien no se aislaba ningún agente, de igual forma se encontró que la prueba serológica PLEUROTTEST no identificó al 68.5% de los casos con este tipo de lesión.

En cuanto a las lesiones tipo consolidación gris PLEUROTTEST detectó el 27.9% de reactivos positivos en donde en ocasiones se aisló el Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 y en otras se encontró en combinación con Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2 y Pasteurella multocida o bien no se aisló ningún agente, por otra parte se encontró que la prueba serológica no identificó el 72.1% de los casos con este tipo de lesión.

Finalmente en los pulmones sin cambios patológicos aparentes

PLEUROTTEST detectó el 16.7% de reactores positivos en donde en ocasiones se aisló Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 y en otras se encontró mezclado con Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2 y Pasteurella multocida o bien no se aisló ningún agente y también se encontró que la prueba serológica no detectó el 83.3% de los casos (Cuadro 6 ).

Por otro lado con los resultados obtenidos de PLEUROTTEST con las pruebas de aglutinación lenta en tubo y lenta en tubo con 2-Mercaptoetanol, muestran que invariablemente cuando la prueba de 2-Mercaptoetanol es positiva a títulos superiores o iguales a 1:50 el ensayo serológico PLEUROTTEST muestra una reacción positiva (Cuadro 7).

De los 93 sueros de granja se encontraron 84 sueros positivos (90.3%) y 9 negativos ( 9.7%); en esta granja en todos los pulmones se aisló Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1, serotipo 1.

Cuadro 6. Se muestran los resultados obtenidos de la prueba serológica PLEUROTTEST, con los resultados obtenidos a partir de los pulmones con los diferentes tipos de lesiones.

Prueba serológica con AP, serotipo 1 <sup>1</sup>	Aislamiento bacteriano	Tipo de lesión				Total
		CGR	CFH	CG	SCPA	
Pleurotest (+)	- Negativo	4	7	7	6	24
Pleurotest (-)	- Negativo	9	20	18	33	80
Pleurotest (+)	- AP <sub>1</sub>	2	1	2	0	5
Pleurotest (-)	- AP <sub>1</sub>	1	3	4	2	10
Pleurotest (+)	- AP <sub>2</sub>	2	3	4	4	13
Pleurotest (-)	- AP <sub>2</sub>	6	11	12	16	45
Pleurotest (+)	- AP <sub>1</sub> AP <sub>2</sub>	0	1	1	1	3
Pleurotest (-)	- AP <sub>1</sub> AP <sub>2</sub>	0	1	2	1	4
Pleurotest (+)	- AP <sub>1</sub> Past.	1	1	2	0	4
Pleurotest (-)	- AP <sub>1</sub> Past.	1	2	1	3	7
Pleurotest (+)	- AP <sub>2</sub> Past.	2	3	3	1	9
Pleurotest (-)	- AP <sub>2</sub> Past.	7	7	12	6	32
Pleurotest (+)	- AP <sub>1,2</sub> Past.	0	1	0	0	1
Pleurotest (-)	- AP <sub>1,2</sub> Past.	2	0	1	0	3
Pleurotest (+)	- Past.	6	2	5	2	15
Pleurotest (-)	- Past.	11	6	12	9	38

CGR = Consolidación gris-rojiza.

CFH = Consolidación fibrino hemorrágica.

CG = Consolidación grls.

SCPA = Sin cambios patológicos aparentes.

AP<sub>1</sub> = Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1

AP<sub>2</sub> = Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2

Past. = Pasteurella multocida.

Cuadro 7. Comparación de dos pruebas serológicas con el ensayo PLEUROTTEST.

Prueba de aglutinación en tubo	Prueba de 2-ME	Pleurotest
I 100	+ 50	Reacción positiva
I 100	I 50	Sin reacción
I 100	I 100	Reacción positiva
I 100	+ 50	Reacción positiva
N 25	N 25	Sin reacción
I 50	I 25	Sin reacción
I 50	N 25	Sin reacción
+ 50	+ 50	Reacción positiva
+ 100	+ 100	Reacción positiva
N 25	N 25	Sin reacción
I 50	N 25	Sin reacción
+ 25	+ 25	Sin reacción
I 100	I 100	Reacción positiva
I 100	+ 50	Reacción positiva
+ 50	+ 50	Reacción positiva
+ 50	+ 50	Reacción positiva
+ 50	N 25	Sin reacción
I 100	I 100	Reacción positiva
I 50	+ 25	Sin reacción
I 100	I 100	Reacción positiva
+ 100	+ 50	Reacción positiva
+ 100	N 25	Sin reacción
I 100	I 100	Reacción positiva
+ 400	+ 400	Reacción positiva
I 100	+ 50	Reacción positiva
I 200	I 200	Reacción positiva
I 25	N 25	Sin reacción

Continuación cuadro 7.

Prueba de aglutinación en tubo	Prueba de 2-ME	Pleurotest
+ 50	+ 50	Reacción positiva
+ 50	I 25	Sin reacción
+ 50	+ 50	Reacción positiva
I 25	N 25	Sin reacción
N 25	N 25	Sin reacción
+ 25	N 25	Sin reacción
I 100	+ 50	Reacción positiva
I 50	I 50	Sin reacción
+ 50	N 25	Sin reacción
I 50	I 25	Sin reacción
I 50	+ 25	Sin reacción
+ 400	+ 400	Reacción positiva
+ 50	N 25	Sin reacción
+ 100	+ 25	Sin reacción
+ 100	+ 100	Reacción positiva
N 25	N 25	Sin reacción

## 8. DISCUSION

La pleuroneumonía contagiosa porcina causada por Actinobacillus pleuropneumoniae y la existencia de varios serotipos, es de gran interés, debido a que ha dado un nuevo enfoque a los estudios inmunopatológicos de esta enfermedad. Este organismo puede causar una infección respiratoria aguda con alta morbilidad y mortalidad o puede causar infecciones persistentes crónicas resultando en pérdidas económicas a los productores de cerdos y bajas ganancias de peso (Kume y cols. 1986).

La transmisión directa a partir de un cerdo infectado a uno susceptible parece ser el medio más frecuente para la dispersión de esta enfermedad (Willson y cols. 1987).

La variabilidad de serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae así como la identificación de este, se ha puesto en evidencia mediante el empleo de pruebas serológicas que han permitido tipificarlo, entre las cuales se encuentran las realizadas por Mittal y cols. (1982) utilizando la técnica de aglutinación en placa; Gunnarson y cols. (1977) aglutinación lenta en tubo; Mittal y cols. (1984) prueba de 2-ME y Mittal y cols. (1983) prueba de coaglutinación, entre otras.

Los ejemplos citados son solo algunas de las pruebas serológicas de gran ayuda para el diagnóstico de la enfermedad.

El presente trabajo se realizó con el fin de encontrar una técnica diagnóstica que pudiera tener las propiedades de especificidad y sensibilidad, tal es el caso de la prueba serológica denominada PLEUROTTEST prueba que fue patentada por la UNAM. Esta prueba se realiza como una alternativa confiable en la determinación de anticuerpos séricos como técnica de diagnóstico de la infección ya existente.

Los serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae encontrados en México son variados, los primeros trabajos de Ciprián y cols. (1988) durante 8 meses en que realizaron 30 inspecciones a nivel de rastro en Ferrería D.F., observaron 41,060 pulmones de cerdos de abasto. Durante este período se colectaron pulmones con PCP y se seleccionaron aleatoriamente para su estudio bacteriológico. El porcentaje de aislamientos que obtuvieron fue de 67.7% de lesiones pleuroneumonias agudas y 32.3 % de lesiones pleuroneumonias crónicas, mismas lesiones que encontramos en este trabajo. Además aislaron 40 cepas, de Actinobacillus pleuropneumoniae que fue identificado como serotipo 1.

En nuestro estudio el porcentaje de aislamientos que se obtuvo fue de 21.8% de lesiones pleuroneumonias agudas y 1.8 % de lesiones pleuroneumonias crónicas, estos porcentajes difieren bastante de los obtenidos por Ciprián y col. (1988) debido a que ellos realizaron un muestreo más amplio y en más tiempo que el utilizado para el presente estudio y a que estos porcentajes corresponden solo de lesiones CFH típicas de PCP. Además de que solo identificaron al serotipo 1 y nosotros identificamos al serotipo 1, 3, 5 y 7.

Aun cuando se aisló Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1 de una pasteurelisis pulmonar en donde también se aislaba Pasteurella multocida fue evidente que en esos pulmones existió una interacción entre estas dos bacterias (Kume y cols. 1986).

Hoffman y cols (1989) establecieron que ha menudo es más difícil aislar el Actinobacillus pleuropneumoniae de animales con lesiones pulmonares crónicas, en este tipo de lesiones Actinobacillus pleuropneumoniae está generalmente en muy bajo número y casi siempre coexiste con bacterias tales como Pasteurella multocida, Streptococcus alfa o beta hemolíticos y Corynebacterium pyogenes.

Por otra parte en recientes trabajos japoneses se ha aislado

Actinobacillus pleuropneumoniae a partir del 47% de las cavidades nasales de cerdos aparentemente sanos de todas las edades (Kume y cols. 1984). El presente estudio se realizó con pulmones muestreados completamente al azar en donde se encontraron pulmones con y sin cambios patológicos aparentes y en donde Actinobacillus pleuropneumoniae y Pasteurella multocida se lograron aislar, estos resultados concuerdan con los de Pijoan y cols. (1983) quien recomienda también realizar el estudio bacteriológico de pulmones macroscópicamente sin lesiones ya que de estos es posible también recuperar A. pleuropneumoniae en un buen porcentaje, quedando de manifiesto que el aislamiento e identificación de Actinobacillus pleuropneumoniae es difícil.

En lo que respecta a los casos sin cambios patológicos aparentes también se aislaron Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1 y Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2 así como Pasteurella multocida, es importante destacar que estos pulmones aparentemente sanos estaban eliminando al agente por lo que se consideraron a estos cerdos como portadores sanos o asintomáticos (Rapp y cols. 1985).

Por otra parte de los pulmones muestreados se obtuvieron aislamientos individuales de Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 1, Actinobacillus pleuropneumoniae biovariedad 2, Pasteurella multocida y las diferentes combinaciones entre ellas tanto de pulmones con lesiones típicas de PCP como de aquellas que no lo eran.

La prueba serológica PLEUROTTEST con el serotipo 1 solo identificó los casos en donde estaba presente dicho serotipo (3.4 %), el bajo porcentaje nos indicó que en los pulmones con lesiones de consolidación fibrino hemorrágica típicas de PCP no siempre está involucrado el serotipo 1. Diaz y cols. (1989) realizaron un estudio

de 76 pulmones de cerdo de animales con pleuroneumonía, procedentes de diferentes granjas de 9 estados de la República Mexicana: Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Puebla, Estado de México, Sonora, Querétaro, Yucatán y Distrito Federal; los aislamientos se realizaron con muestras obtenidas de 1985 a 1988; de estas muestras se aislaron el 88 % de Actinobacillus pleuropneumoniae de los cuales 53% de los aislamientos correspondieron al serotipo 1 seguido del serotipo 5 con el 10 % y en menor proporción se aislaron los serotipos 3,2,4,7 y 8.

Los serotipos encontrados en mayor porcentaje fueron el serotipo 1 y 5, esto explicaría que a pesar de haber aislado A. pleuropneumoniae de pulmones con lesiones de PCP; con lesiones típicas de una Pasteurellosis pulmonar o de pulmones aparentemente sanos, la serología con PLEUROTTEST fuera baja, ya que solo fue probada con el serotipo 1.

Tal como lo reportó Díaz y cols. (1989), existen varios serotipos en el país situación que se esperaba por la comercialización de cerdos con Estados Unidos y Canadá en donde tienen los serotipos 1,3,4,5 y 7 y 1,2,3,5 y 7 respectivamente (Nicolet 1985; Nielsen 1985).

De los casos en donde se aisló exclusivamente A. pleuropneumoniae biovariedad 2 y fueron positivos a PLEUROTTEST no se descarta la posibilidad de una reacción cruzada ya que estudios han demostrado que A. pleuropneumoniae biovariedad 2 cruza con el serotipo 2 de A. pleuropneumoniae biovariedad 1 (Fodor y cols. 1989).

Con la prueba serológica PLEUROTTEST se hicieron reaccionar con sueros de 293 cerdos, así mismo, se realizó el examen macroscópico de los pulmones con el fin de encontrar lesiones características de la infección por Actinobacillus pleuropneumoniae y por último el aislamiento del Actinobacillus pleuropneumoniae, estos dos últimos sirvieron como referencia en los resultados obtenidos con el

PLEUROTTEST, además del uso de esta prueba se utilizó la prueba de aglutinación con 2-ME y aglutinación en tubo en donde se encontró que en la prueba de 2-ME con títulos mayores o iguales a 50 se correlacionó totalmente con PLEUROTTEST en forma positiva, por otra parte las pruebas de aglutinación en tubo y aglutinación con 2-ME dieron lecturas de incompletos, no proporcionando confiabilidad en los resultados. Esto puede ser debido a que en la prueba de 2-ME el mercaptoetanol destruye a la IgM lo que reduce las reacciones inespecíficas pero también elimina algunas reacciones específicas (Tizard 1982).

Mittal y cols. (1984) realizaron un estudio en el que compararon la prueba de 2-ME como una alternativa a las pruebas de fijación de complemento y aglutinación en tubo, en la que esta última dio un 100 % de reacciones no específicas mientras que la prueba de 2-ME fue más específica y más sensible que la prueba de fijación de complemento.

Estas dos pruebas son las más empleadas dando buenos resultados, sin embargo, estas pruebas no son tan sensibles y algunos portadores pueden pasar inadvertidos (Schultz y cols. 1982).

Algunos de los inconvenientes que afectaron los resultados fue la presencia de cierto grado de hemólisis en algunos de los sueros, así como la posible presencia de anticuerpos inespecíficos provenientes de algún otro microorganismo, además por una concentración elevada de proteínas en los sueros, todo esto puede causar reacciones inespecíficas.

No se puede rechazar la utilidad del PLEUROTTEST como una prueba de ayuda diagnóstica de la pleuroneumonía contagiosa porcina ya que es una prueba rápida, fácil de realizar y confiable.

Por el momento se puede decir que la prueba es efectiva, sin embargo es necesario ampliar el número de antígenos de tal manera que

sea más representativa y detecte los anticuerpos de los demás serotipos y tomar en cuenta el analizar muestras provenientes de diferentes localizaciones geográficas del país y reforzar los resultados que se obtendrían con el PLEUROTEST.

## 9. CONCLUSION

De los 293 pulmones colectados durante 6 meses se encontró 21.8% de lesiones tipo CFH típicas de pleuroneumonía contagiosa porcina.

Se aisló A. pleuropneumoniae serotipo 1 biovariedad 1 y A. pleuropneumoniae biovariedad 2 de pulmones de los cerdos de abasto.

Se logró el aislamiento de A. pleuropneumoniae serotipo 1,3,5 y 7 a nivel de granja y rastro.

De los sueros probados con el PLEUROTTEST que correspondieron a pulmones con lesiones tipo CFH típicas de pleuroneumonía contagiosa porcina, fueron positivos al serotipo 1 de A. pleuropneumoniae

Se determinó la posible presencia de reacciones cruzadas entre A. pleuropneumoniae serotipo 1 biovariedad 1 y A. pleuropneumoniae biovariedad 2.

Existió una correlación entre el aislamiento y la serología bajo las condiciones de este trabajo.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Allan G.S.; Chapel R.J.; Williamson P. and Mc.Naught D.J. (1976). 'A quantitative comparasion of the sensitivity of serological test for bovine brucellosis to different antibody classes.' J. Hyg. Camb. 76 287-298.
2. Bertschinger H.U. and Seifert P. (1978). 'Isolution of a Pasteurella haemolytica-like organism from porcine necrotic pleuropneumoniae.' Abstact M19, Proc 5+ Int pig Vet. Soc. Congr. Zagreb.
3. Bjorlund, W.E. (1965) 'Studies on pneumonia and atrophic rhinitis in pigs. On variation caused by enviroment, breed and sex.' Nord. Vet. Med. 17, 137-146.
4. Bossé T.J., Johnson P.R., Rosendal S. (1990). 'Serodiagnosis of pleuropneumoniae using Enzime-linked Immunosorbent assay with capsular polisaccharide antigens of Actinobacillus pleuropneumoniae serotypes 1,2,5 and 7.' Can. J. Vet. Res. 54: 427-431.
5. Ciprián C.A., Medina G.A., Fuentes R.M., Pijoan A.C., Torres A.O., Colmenares V.G., Camacho M.J. (1988). 'Serotipificación de Haemophilus pleuropneumoniae aislados de cerdos en México.' Vet. Méx. 19: 205-209
6. Cole J.R., Sangster L.T. and Cooper J.A. (1978) 'Haemophilus paraahaemolyticus associated with pleuropneumonia in Georgia swine.' Vet. Méx. Small. Anim. Clin. 73:1444-1446

7. Cowan S.T. and Steel J. (1974). 'Manual for identification of medical bacteria.' 2th Ed. Cambridge Univ. Press. 137-142.
8. Chang C., Yamamoto K., Konishi S. and Ogata M. (1978) 'Isolation and antigenic characterization of Haemophilus parahaemolyticus from porcine pneumonia.' Jap. J. Vet. Sci. 40:103-107
9. Chiang Wei-Yu., Young F.F. Happ J.V., and Ross F.R. (1991). 'Improved protection of swine from pleuropneumonia by vaccination with proteinase k-treated outer membrane of Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae.' Vet. Microb. 27: 49-62
10. Diaz C., González M., Jiménez E. y Stephano A. (1989). 'Identificación de diferentes serotipos de Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae aislados en México de cerdos con pleuropneumonia de 1985 a 1988.' Vet. Méx. 20:157 160
11. Didier P., Perino L., Urbance J. (1984). 'Porcine Haemophilus pleuropneumoniae: Microbiologic and pathologic findings.' Jour. Am. Vet. Med. Assoc. Vol.184 No. 6 716-719
12. Fedorka-Cray P.J., Huether M.J., tinc D.L., Anderson G.A. (1990). 'Efficacy of a cell extract of Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae serotype 1 against disease in swine.' Infect. Immun. 58: 358-365
13. Fenwick B.W., Osburn B.I. (1986). 'Immune responses to the lipopolysaccharide and capsular polysaccharides of Haemophilus pleuropneumoniae in convalescent and immunized pigs.' Infect. Immun. 54: 575-582.

14. Flores M.A., Agraz G.A., (1988). 'Enciclopedia técnica del ganado porcino'. Editorial Ciencia y tecnología, vol. 4 pp 1169.
15. Fodor L., Varga J., Molnar E. and Hajtos I (1989). 'Biochemical and serological properties of Actinobacillus pleuropneumoniae biotype 2 strains isolated from swine.' Vet. Microbiol. 20:173-180.
16. Freese W. (1990). 'Síndrome clínico y procedimientos de tratamiento para Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae.' Compendio sobre Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae. Guadalajara Jal.
17. Frey J., Nicolet J. (1988) 'Purification and partial characterization of a hemolysin produced by Actinobacillus pleuropneumoniae.' FEMS Microbiol. Let. 55: 41-46.
18. Frey L., Perrin J., Nicolet J. (1989). 'Cloning and expression of a cohemolysin, the CAMP factor of Actinobacillus pleuropneumoniae.' Infect. Immun. 57:2050-2056.
19. Gilbride K.A., Rosendal S. (1983). 'Evaluation of a selective medium for isolation of Haemophilus pleuropneumoniae.' Can. J. Comp. Med. 47: 445-450
20. Gunnarson A., Biberstein E.L. and Hurvell . (1977). 'Serologis studies on porcine strains of Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae) : Agglutination reactions.' Am. J. Vet. Res. : 1111-1114.

21. Gunnarson A., Hurvell B. and Biberstein E.L. (1978). 'Serological studies of porcine strains of Haemophilus paraaemolyticus (pleuropneumoniae): Antigenic specificity and relationship between serotypes.' Am. J. Vet. Res. 39:1286-1292
22. Hoffman J.K. (1989). 'Actinobacillus (Haemophilus) Pleuropneumoniae: Use of Co-agglutination and complement fixation to determine the relationship between presence of organism and antibody titer in slaughterhouse pigs.' J. Vet. Diagn. Invest. 1: 12-15.
23. Hommez J., Devriese L.A., Castrick F. and Cassimon. (1990). 'Slide precipitation: A simple method to type Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae.' Vet. Microb. 24: 123-126.
24. Hsu F.S., Weng C.N., Cou N.Y. and King J.H. (1976). 'Pathogenicity of Haemophilus paraaemolyticus for swine.' Proc IPVS 4 p 20
25. Hunter D., Livingstone J. (1986). 'Detection of Haemophilus pleuropneumoniae antigens using the coagglutination test.' The Vet. Rec. 118: 129.
26. Inzana T.J. and Mathison B. (1987). 'Serotype specificity and Immunogenicity of the capsular polymer of Haemophilus pleuropneumoniae serotype 5.' Infect. Immun. Vol.56 No.7 1580-1587
27. Inzana T.J., Clarck G., Todd J. (1990). 'A double-label radiolimmunoassay for capsular antibody or antigen of Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae.' J. Clin. Microbiol. 28: 312-318.

28. Kamp M.E., Popma K.J., Anakota J., and Smits M. (1991). 'Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of Actinobacillus pleuropneumoniae by use of monoclonal antibodies.' Infect. Immun. Vol 59 No. 9 3079-3085
29. Killian M., Metscky J. and Schrohenloher R.E. (1979). 'Pathogenic species of the genus Haemophilus and Streptococcus pneumoniae produce immunoglobulin protease.' Infect. Immun. 26: 143-149.
30. Killian M., Biberstein E.L. (1984). Family III Pasteurellaceae genus II Haemophilus In Krieg, NR. (Ed): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1 Baltimore, Williams and Wilkins 558-569
31. Kume K., Nakai T., Sawata A. (1984). 'Isolation of Haemophilus pleuropneumoniae from the nasal cavities of healthy pigs.' Jpn. J. Vet. Sci. 46(5): 641-647.
32. Kume K., Nagano I., and Nakai T. (1986). 'Bacteriological, serological and pathological examinations of Haemophilus pleuropneumoniae infection in 200 slaughtered pigs.' Jpn. J. Vet. Sci. 48(5): 965-970
33. Landquist J.O. (1974). 'Animal and environment in the production patterning pigs.' Acta. Vet. Scand. Suppl. 51.
34. Liggett A.D., Harrison L.R. and Farrell R.L. (1986). 'Acute inflammatory effects of intratracheally instilled Escherichia coli endotoxin and sonicated suspension of Haemophilus pleuropneumoniae in swine.' Can. J. Vet. Res. 50: 526-531.

35. Liggett A.D. and Harrison L.R. (1987). 'Sequential study of lesion development experimental Haemophilus pleuropneumoniae.' Research Vet. Sci. 42, 204-221.
36. Little T.W.A. and Harding J.D. (1971). 'The comparative pathogenicity of two porcine Haemophilus species.' Vet. Rec. 88: 540-545.
37. Lombin L.H., Rosendal S. and Mitchel W.R. (1982). 'Evaluation of the Complement Fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus pleuropneumoniae.' Can. J. Comp. Med. 46: 109-114.
38. MacFaddin F.J. (1980). 'Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.' Ed. Panamericana. Buenos Aires Argentina.
39. Mittal K.R., Higgins R. and Lariviere S. (1982). 'Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae.' J. Clin. Microbiol. 15 (6):1019-1023
40. Mittal K.R., Higgins R. and Lariviere S. (1983). 'Detection of type-specific antigens in the lung of Haemophilus pleuropneumoniae infected pigs by Coagglutination test.' Jour. Clin. Microb. 18, 6 1355-1357
41. Mittal K.R., Higgins R., Lariviere S. and Leblanc D. (1984). 'A 2-Mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae infection in pigs.' Am. Jour. Vet. Res. Vol.45 No.4 715-719

42. 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.' Contemporary Concepts of Haemophilus pleuropneumoniae in pigs. Iowa U.S.A. 24-29.
43. Mitui T., Onaga H., Nagasawa Y., Nomura Y. and Kuramasu S. (1981). 'Studies on Haemophilus infection in swine I. Application of the latex agglutination test to the diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae (H. parahaemolyticus infection).' Vet. Microbiol. 6: 339-349
44. Myrlea P.J., Fraser G., MacQueen P. and Lambourne D.A. (1974). 'Pleuropneumonia in pigs caused by Haemophilus parahaemolyticus.' Aust. Vet. J. 50: 255-259
45. Nakai T., Sawata A., Kume K. (1985). 'Duration of the Complement-fixation antibodies induced in pigs and guinea pigs by Haemophilus pleuropneumoniae vaccine.' Jpn. J. Vet. Sci. 47(3) 503-506.
46. Nicolet J. (1968). 'Sur l'hémophilose du porc. I. Identification d'un agent fréquent: Haemophilus parahaemolyticus.' Path. Microbiol. 31: 215-225
47. Nicolet J., Koning H. and Scholl E. (1969). 'Zur Haemophilus pleuropneumoniae beim Schwein. II. Eine kontagiose Krankheit von wirtschaftlicher Bedeutung.' Schweiz. Arch. Tierheilk. 111: 166-174.
48. Nicolet J. (1971). 'Sur l'hémophilose du porc. III. Différentiation sérologique de Haemophilus parahaemolyticus' Zbl. Bakt., I Abt. Orig. 216, 487-495.

49. Nicolet J., Krawinkler M., and Baumgartner A. (1981). 'An Enzyme-linked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of Haemophilus pleuropneumoniae.' Am. J. Vet. Res. Vol.42 No.12 2139-2142.
50. Nicolet J. (1985). 'Bacteriology and epidemiology of Haemophilus pleuropneumoniae' Contemporary concepts of Haemophilus pleuropneumoniae in pigs in Iowa USA p 3-7.
51. Nielsen R. (1970). 'Pleuropneumoni hos svin, fremkaldt af Haemophilus parahaemolyticus. I.Kliniske patologisk-anatomiske og epidemiologiske undersøgeleser.' Nord. Vet. Med. 22:240-245
52. Nielsen R. (1974). 'Serological and Immunological studies of pleuropneumonia of swine caused by Haemophilus parahaemolyticus.' Acta. Vet. Scand. 15, 80-89.
53. Nielsen R., Mandrup M. (1977). 'Pleuropneumonia in swine caused by Haemophilus parahaemolyticus. A study of the epidemiology of the infection.' Nord. Vet. Med. 29: 465-473
54. Nielsen R. Thesis, Copenhagen, 1982.
55. Nielsen R. (1984). 'Serological characterization of 8 Haemophilus pleuropneumoniae strains and proposal of a new serotype: 8.' Acta. Vet. Scand. 25: 96-106.
56. Nielsen R. (1985). 'Immunity and control of Haemophilus pleuropneumoniae.' Contemporary concepts of Haemophilus pleuropneumoniae in pigs. Iowa USA 14-18

57. Diander H.J. (1963). 'A septicemic disease of swine and its causative agent Haemophilus pleuropneumoniae.' USA thesis doctorado Universidad de California.

58. PiJoan A.C., Ochoa U.G., Méndez M.D. y Lastra G.A. (1978). 'Aislamiento de Haemophilus parahaemolyticus de cerdos con neumonia.' Tec. Pec. Méx. 34:85-87

59. PiJoan C., Morrison B.R. and Hilly D.H. (1983) 'Dilution technique for isolation of Haemophilus from swine lungs collected at slaughter.' Jour. Clin. Microbiol. 18: 143-145

60. PiJoan C. (1985). 'Serology and immunology of Haemophilus pleuropneumoniae.' Contemporary concepts of Haemophilus pleuropneumoniae in swine, Iowa USA, 21.

61. PiJoan C., Ultrera V. y Zhao G. (1991). 'Epidemiología y serología en enfermedades respiratorias del cerdo' AMVEC Mérida.

62. Pittman M. (1953). 'A clasification of the hemolytic bacteria of the genus Haemophilus: Haemophilus haemolyticus Bergey et. al. and Haemophilus parahaemolyticus.' Jour. Bact. 65, 750-751

63. Pohl S., Bertschinger H.U., Frederiksen W. and Manheim W. (1983). 'Transfer of Haemophilus pleuropneumoniae and the Pasteurella haemolytica like organism causing porcine necrotic pleuropneumoniae to the genus Actinobacillus on the basis of phenotypic and deoxiribonucleic acid relatedness.' Jour. Syst. Taxon. 33:510-514

64. Rapp J.V., Ross F.R. and Young F.T. (1985). 'Characterization of Haemophilus spp. Isolated from healthy swine and evaluation of cross-reactivity of Complement-fixing antibodies to Haemophilus pleuropneumoniae and Haemophilus taxon 'minor group'.' Jour. Clin. Microbiol. Vol. 22 No. 6 945-950
65. Rapp V.J., Ross R.F. and Zimmerman E. (1985). 'Serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody test in swine.' Am. J. Vet. Res. 46: 185-192.
66. Rosendal S. and Boyd D.A. (1982). 'Haemophilus pleuropneumoniae serotyping.' Jour. Clin. Microb., 16,5: 840-843.
67. Rousseau P., Assaf R., Boulay G. and Désy M. (1988). 'Immune response to an Actinobacillus pleuropneumoniae vaccine in swine.' Can Vet. J. Vol.29: 989-992.
68. Sanford S.E. and Josephson G.K.A. (1981). 'Porcine Haemophilus pleuropneumonia epizootic in southwestern Ontario. Clinical, microbiological, pathological and some epidemiological findings.' Can. J. Comp. 45:2-7
69. Sebunya T.N.K. and Sandders J.R. (1983). 'Haemophilus pleuropneumoniae infection in swine.' A review. J. Am. Vet. Med. ASS: 182: 1331-1337.
70. Schiefer B., Moffatt R.E., Greenfield J., Agar J.L. and Majka J.A. (1974). 'Porcine Haemophilus parahaemolyticus pneumonia in Saskatchewan I. Natural occurrence and findings.' Can. J. Comp. Med. 38: 99-104.

71. Schultz R.A., Young T.A., Ross R.F. and Jeske D.R. (1982). 'Prevalence of antibodies to Haemophilus pleuropneumoniae in Iowa swine.' Am. J. Vet. Res. 43: 1848-1851
72. Schultz R.A. (1985)(editor). Compendium on swine Haemophilus pleuropneumoniae" SDS. Biotech. Corporation, Ames, Iowa USA.
73. Shope R.E. (1964). 'Porcine contagious pleuropneumonia I. Experimental transmission, etiology and pathology.' J. Exp. Med. 119: 357-368.
74. Stites P.D., Stobo D.J., Fudenberg H.H., Wells V.J. (1983). 'Inmunología básica y clínica' Editorial El Manual Moderno, 4ª edición pp 357-358.
75. Stephano H.A. y Díaz R.C. (1990). 'Experiencias con pleuropneumonia de los cerdos por Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae en México. AHVEC Guadalajara.
76. Sutherland S.S. (1980). 'Immunology of bovine brucellosis.' The Veterinary Bulletin Vol.50 No 5 359-368.
77. Tielsen M.J.M. (1978). 'Building, enviromental conditions and diseases.' Proc AUEA and Prod. 747.
78. Tizard R. Ian (1982). 'Inmunología Veterinaria' Ed. Interamericana
79. Willson J.P., Falk G. and Klashinski S. (1987). 'Detection of Actinobacillus pleuropneumoniae Infection in pigs.' Can. J. Vet. vol.28 No. 3 111-116

80. Yamamoto K., Ogata M. (1980). 'The use of agglutination test in the serological diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae infections in pigs.' In proceedings, Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Copenhagen, Denmark 218.