

83
29



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Aislamiento y Determinación de Serotipos
de Haemophilus pleuropneumoniae a partir
de Pulmones Neumonicos de Cerdos**

T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Mara Elma González Ortíz

**Asesores: M.V.Z. Concepción Díaz Rayo
M.V.Z. Emilio Trigo Tavera
M.V.Z. Alicia Méndez Guerrero**



México, D. F.

1987



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.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	12
CUADROS	13
DISCUSION	15
LITERATURA CITADA	17

RESUMEN

GONZALEZ ORTIZ, MARA ELMA. Aislamiento y determinación de serotipos de Haemophilus pleuropneumoniae a partir de pulmones neumónicos de cerdos (bajo la dirección de: Concepción Díaz Rayo, Emilio Trigo Tavera y Alicia Méndez Guerrero).

Anteriormente las cepas aisladas de H. pleuropneumoniae eran enviadas a los Estados Unidos para serotipificarlas, por lo que se presentó la necesidad de elaborar antisueros en México. El objetivo del presente estudio fue determinar qué serotipos de H. pleuropneumoniae se encuentran involucrados en los procesos neumónicos de algunos cerdos de los estados de Guanajuato, Michoacán, Estado de México, Puebla y rastro de Ferrería, D.F. De un total de 70 muestras colectadas entre noviembre y diciembre de 1985, 33 (47.14%) fueron identificadas como H. pleuropneumoniae por medio de pruebas bioquímicas. Los serotipos encontrados fueron: Serotipo uno 23 casos (69.69%), serotipo cuatro 2 casos (6.06%), serotipo cinco 3 casos (9.09%), serotipo seis 1 caso (3.03%), serotipo siete 2 casos (6.06%), serotipo ocho 1 caso (3.03%) y una cepa no tipificable (3.03%). En el estudio de distribución geográfica se observó mayor variedad de serotipos en los estados de Michoacán y Guanajuato, encontrándose los serotipos 1, 4, 5, 6, 7 y 8 así como una cepa no tipificable, mientras que del rastro de Ferrería no se logró el aislamiento de ninguna cepa de

H. pleuropneumoniae. En esencia se recuperaron los mismos serotipos encontrados en otros países del continente americano, además de los serotipos 6 y 8 que no habían sido descritos en este continente.

INTRODUCCION

El Haemophilus pleuropneumoniae es el agente causal de la pleuroneumonía porcina (10, 13, 15, 20, 30) la cual es severa y comúnmente fatal (30). La enfermedad fue descrita por primera vez en Estados Unidos (29) y Argentina (31) hace más de 20 años. En México Pijoan et al. (20) realizaron el primer reporte de la enfermedad en 1978 a partir de cerdos originarios de Tlaxcala y La Piedad, Michoacán. La pleuroneumonía porcina también ha sido reconocida en Canadá (26) y en algunos países europeos (25, 29).

Dependiendo del estado de inmunidad de los animales y del estado de tensión debido a condiciones adversas, y del grado de exposición del agente causal, el curso clínico de la enfermedad puede ser: sobreagudo, agudo, subagudo o crónico (14).

En la forma sobreaguda uno o varios cerdos del mismo o de diferentes hatos presentan fiebre repentinamente (41.5°C), están apáticos y con anorexia. Se presenta un período corto con diarrea ligera y vómito. Los animales afectados están postrados sin signos respiratorios. En la fase terminal hay disnea severa, jadean y presentan descargas de líquido sanguinolento por nariz y boca. El pulso aumenta su frecuencia y se presentan problemas circulatorios y cardiacos. La piel de nariz, orejas, piernas y posteriormente todo el cuerpo se observa cianótico. La muerte ocurre entre las 24-36 horas. En ocasiones

en cerdos jóvenes se desarrolla una septicemia y dá como resultado la muerte en ausencia de signos clínicos (14).

En la forma aguda las características de la enfermedad son las siguientes: muchos cerdos del mismo o de diferentes hatos son afectados. La temperatura es menor que en la forma sobreaguda (40.5-41°C). Los animales están deprimidos y rehúsan comer. Los signos respiratorios severos con disnea, tos y a veces jadeo, son evidentes. Usualmente se presentan fallas cardíacas y circulatorias. El curso de la enfermedad difiere de animal a animal dependiendo de la extensión de las lesiones pulmonares y del tiempo que se tarde en comenzar la terapia (14).

Las formas subaguda y crónica se desarrollan después de que desaparecen los signos de la forma aguda. Hay poca o ausencia de fiebre y la tos se vuelve intermitente o espontánea. Los animales muestran pérdida de apetito y por lo tanto baja la ganancia de peso (14).

En hatos infectados en la forma crónica, usualmente hay muchos animales que presentan la enfermedad subclínica. Los signos clínicos se pueden exacerbar por otras infecciones respiratorias (neumonía por mycoplasma, Pasteurella multocida, Bordetella bronchiseptica, etc.). En brotes primarios, sobre todo en hatos de cerdos libres de patógenos específicos (SPF), se pueden observar abortos (14).

Las lesiones que produce el H. pleuropneumoniae son en el aparato respiratorio. Las lesiones neumónicas son bilaterales y generalmente se encuentran en los lóbulos caudales, pero

pueden ocurrir en los lóbulos craneales y mediales (10, 29, 30). Las lesiones son generalmente focales y bien delimitadas. Las áreas neumónicas son oscuras y consolidadas. Se presenta pleuritis fibrinosa. La cavidad torácica contiene fluido rojo obscuro. En muchos de los casos crónicos se forman nódulos de diferentes tamaños localizados en los lóbulos diafragmáticos y están delimitados por una cápsula de tejido conectivo y algunas áreas de la pleura se encuentran adheridas (14). Las lesiones características en la forma sobreaguda y algunos estadios de la forma aguda se pueden comparar con las lesiones observadas en un choque endotóxico. Estas lesiones consisten en edema alveolar e interlobular, con dilatación de vasos linfáticos, congestión hemorrágica y trombosis fibrinosa (29).

Estudios in vivo (23) e in vitro (1) han demostrado que el H. pleuropneumoniae produce sustancias termolábiles y termoeestables que son tóxicas para los macrófagos alveolares del cerdo.

Otros estudios han demostrado que la bacteria tiende a multiplicarse en tejido pulmonar normal (5, 28). Esto manifiesta que el patógeno tiene propiedades que interfieren con las funciones pulmonares resultando en la multiplicación en vez de la remoción de los organismos (28).

Se cree que la cápsula o la endotoxina de la bacteria, o ambas, pueden interferir con los mecanismos de la defensa humoral o fagocitosis del H. pleuropneumoniae y así impedir la remoción bacteriana del pulmón (1).

La enfermedad se transmite por vía aérea o por contacto

directo cerdo-cerdo. Cualquier edad es susceptible (14).

El nombre de H. pleuropneumoniae y H. parahaemolyticus pueden ser usados indistintamente para referirse a organismos que ahora son considerados como una sola especie del género Haemophilus (7, 8, 11, 29, 31).

El género Haemophilus comprende bastones o cocobacilos Gram negativos con requerimiento del factor X (hemina o tal vez otras porfirinas), el factor V (Nicotinamida Adenin Dinucleótido), o ambas, así como otras sustancias parecidas estructuralmente a coenzimas (32). Estos requerimientos han sido usados para asignar a estos organismos a especies dentro de este género. Con base en los factores de crecimiento X y V, originalmente fueron identificadas 19 especies (3, 4).

El H. pleuropneumoniae requiere unicamente del factor V y como es hemolítico (2, 7, 29) es considerado sinónimo de H. parahaemolyticus (19, 33).

Killian (7) estudió 426 cepas de Haemophilus de origen y patogenicidad heterogénea, usando una variedad de métodos. Sus resultados permitieron aclarar la taxonomía del género y mas específicamente la agrupación del H. parahaemolyticus/pleuropneumoniae de origen porcino como una especie particular. En sus conclusiones Killian et al. (8) recomiendan el uso de H. pleuropneumoniae para reemplazar el de H. parahaemolyticus. Biberstein et al. (2), con base en las pruebas de urea y porfirina, presuntivamente asignaron 22 cultivos de Haemophilus porcinos a tres especies llamándolas: H. para-

haemolyticus/pleuropneumoniae, H. parasuis y H. suis. Los tres fueron identificados como sigue:

	UREA	PORFIRINA	FACTOR V	FACTOR X
<u>H. pleuropneumoniae</u>	+	+	dependiente	independ.
<u>H. parasuis</u>	-	+	dependiente	independ.
<u>H. suis</u>	-	-	dependiente	dependiente

Otros estudios han demostrado que es posible distinguir el H. pleuropneumoniae de otros Haemophilus porcinos con base en sus características de crecimiento, pruebas bioquímicas y serológicas (29).

Pohl et al.(22), con base en el fenotipo y a la relación de ácido desoxirribonucleico transfieren el H. pleuropneumoniae al género Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae).

Las características celulares del H. pleuropneumoniae son: Gram negativo, inmóvil, no esporula, bastones pleomórficos con predominancia de formas cocobacilares (29, 31). Formas filamentosas del organismo son raras en cultivos jóvenes, pero llegan a ser mas y mas prominentes entre las 24 y 96 horas de incubación (29). La cápsula comunmente está presente (16, 27).

El organismo crece rápidamente en un medio de cultivo enriquecido para formar colonias mucosas e iridicentes (13, 27). En agar sangre de borrego o becerro, las colonias usualmente producen una zona Beta-hemolítica (6). La hemolisina actúa sinérgicamente con la toxina Beta del Staphylococcus aureus en eritrocitos de borrego o becerro para dar varios grados de reacción de CAMP positiva (6). La susceptibilidad de la sangre de

diferentes especies animales a ser hemolizada de mayor a menor grado, es en la siguiente forma: becerro, borrego, humano, conejo, pollo y caballo.(6).

HIPOTESIS

Existen diferentes serotipos de Haemophilus pleuropneumoniae involucrados en los procesos neumónicos de los cerdos en algunas zonas porcícolas del país.

OBJETIVO

Determinar los serotipos de Haemophilus pleuropneumoniae en pulmones neumónicos de algunas granjas en los estados de Guanajuato, Michoacán, Estado de México, Puebla y rastro de Ferrería, D.F.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectaron 70 pulmones con lesiones sospechosas de haber sido producidas por Haemophilus pleuropneumoniae procedentes de Michoacán (14), Guanajuato (11), Estado de México (3), Puebla (2) y rastro de Ferrería, D.F. (40). Las muestras se sembraron en gelosa sangre con cepa nodriza (Staphylococcus aureus) las cuales se incubaron a 37°C por 24 horas. Se aislaron 33 cepas que por su morfología colonial y las siguientes pruebas bioquímicas se determinó que eran H. pleuropneumoniae: motilidad (-), indol (-), urea (+), nitratos (+), maltosa (+), manitol (+), xilosa (+), lactosa (+), sacarosa (+), glucosa (+) y ácido sulfúrico (-) (2, 20). Las cepas identificadas se liofilizaron para su posterior serotipificación.

Para producir los antisueros se inocularon dos conejos por cada una de las 9 cepas tipo de H. pleuropneumoniae*.

La primera inoculación fue el día 1, por vía IM se administró 2 ml de adyuvante de Freund combinado con 2 ml de antígeno inactivado con 1% de formalina. Quince días después se continuó inoculando dos veces por semana hasta la última inoculación. En la segunda, tercera y cuarta inoculaciones se administró 0.5 ml de antígeno con 0.2% de formalina por vía IV. De la quinta a la octava inoculación se administró 0.5 ml de antígeno vivo por vía IV.

*Las 9 cepas de referencia fueron donadas gentilmente por el Dr. J. Nicolet del Instituto de Bacteriología Veterinaria de la Universidad de Berne, Suiza.

Para preparar el antígeno se sembró cada cepa en una caja de Petri con medio de Levinthal (9) en cultivo masivo, se incubaron de 6 a 9 horas; se cosecharon con solución buffer fosfatada (PBS) (24) y asa de vidrio esteril para desprender las colonias del medio; se centrifugó a 800 g por 15 minutos, se quitó el sobrenadante y con el sedimento se preparó el inóculo ajustándolo al No. 4 del nefelómetro de Mac Farland.

Ocho días despues de la última inoculación se sangraron los conejos en blanco por punción cardiaca. En matraces estériles se colectó la sangre, se dejó formar el coágulo y se cosechó el suero, éste se esterilizó por filtración y se tituló con diluciones dobles.

Con el título mas alto se tipificaron las cepas problema por aglutinación rápida en placa (22).

RESULTADOS

De noviembre a diciembre de 1985 se llevó a cabo la recolección de 70 pulmones sospechosos de pleuroneumonía porcina, obteniéndose 33 cepas (47.14%) de Haemophilus pleuropneumoniae, de las cuales 7 se obtuvieron de tres diferentes casos.

En el Cuadro 1 se indica la distribución de serotipos aislados de H. pleuropneumoniae, en número de cepas y su valor porcentual. En el Cuadro 2 se muestra la distribución geográfica de los diferentes serotipos aislados, observándose que la mayor variedad de serotipos se obtuvieron de las muestras colectadas en Michoacán y Guanajuato. Del rastro de Ferrería no se logró obtener ninguna cepa.

CUADRO 1
DISTRIBUCION DE LOS DIFERENTES SEROTIPOS AISLADOS
DE Haemophilus pleuropneumoniae

SEROTIPOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	NT*	TOTAL
No. AISLAMIENTOS	23	0	0	2	3	1	2	1	0	1	33
PORCENTAJE	69.69	0	0	6.06	9.09	3.03	6.06	3.03	0	3.03	100

*No tipificable

CUADRO 2

DIFERENTES SEROTIPOS AISLADOS DE Haemophilus pleuropneumoniae
DISTRIBUCION GEOGRAFICA

SEROTIPOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	NT	TOTAL de CEPAS
MICHOACAN	11 68.75%	0	0	0	1 6.25%	1 6.25%	2 12.5%	1 6.25%	0	0	16 100%
GUANAJUATO	9 75%	0	0	1 8.33%	1 8.33%	0	0	0	0	1 8.33%	12 100%
ESTADO DE MEXICO	3 100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 100%
PUEBLA	0	0	0	1 50%	1 50%	0	0	0	0	0	2 100%
RASTRO DE FERRERIA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

DISCUSION

De las 33 cepas de Haemophilus pleuropneumoniae que se lograron aislar en el presente estudio, 23 (69.69%) fueron serotipo 1, siendo éste el único descrito en México antes de este trabajo (12).

Además se recuperaron los serotipos 4, 6, 7 y 8 de los cuales el 6 y el 8 no se encuentran entre los informes publicados en otros países del continente americano (18).

Actualmente se ha identificado un nuevo serotipo en Dinamarca que corresponde al 10. La existencia de una cepa de H. pleuropneumoniae no tipificable, sugiere la presencia de éste u otro nuevo serotipo. Sería conveniente elaborar el antisuero del serotipo 10 para ver si la cepa no tipificable corresponde a éste (17).

El hecho de que en tres casos se haya aislado más de un serotipo, sugiere la presencia de infecciones mixtas que probablemente hagan más difícil su tratamiento y por lo tanto la erradicación.

En el análisis de la distribución geográfica se observó que en los estados de Michoacán y Guanajuato se aislaron cinco de los nueve serotipos que se trabajaron en el presente estudio, mientras que en el estado de México sólo se encontró el serotipo 1.

En los pulmones obtenidos del rastro de Ferrería se observaron lesiones que sugerían casos crónicos, sin embargo,

no se logró ningún aislamiento, en cambio creció gran cantidad de Pasteurella multocida, la cual pudo enmascarar el cuadro. Probablemente usando medios de cultivo selectivos se logró aislar el H. pleuropneumoniae.

A pesar de que el número de muestras y de estados de la República muestreados fue reducido, se obtuvieron datos importantes. Por lo tanto si se aumentara el número de muestras y de zonas muestreadas se sabría si el serotipo 1 es el más importante en prevalencia (12).

LITERATURA CITADA

1. Bendixen, P.H., Shewe, P.E. and Rosendal, S.: Toxicity of Haemophilus pleuropneumoniae for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes, and testicular cells. Infect. Immun., 33: 673-676, (1981).
2. Biberstein, E.L., Gunnarson, A. and Hurvell, B.: Cultural and biochemical criteria for the identification of Haemophilus spp from swine. Am. J. Vet. Res., 38: 7-11, (1977).
3. Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. London Baillière Tindall & Cox, 1957.
4. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1974.
5. Jackson, A.E., Southern, P.M. and Pierce, A.K.: Pulmonary clearance of Gram negative bacilli. J. Lab. Clin. Med., 69: 833-841, (1967).
6. Killian, M.: The hemolytic activity of Haemophilus species. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B., 84: 339-341, (1976).
7. Killian, M.: A taxonomic study of genus Haemophilus, with the proposal of a new species. J. Gen. Microbiol., 93: 9-62, (1976).
8. Killian, M., Nicolet, J. and Biberstein, E.L.: Biochemical and serological characterization of Haemophilus pleuro-

- pneumoniae (Matthew and Pattison). Shope 1964 and proposal of neotype strain. Int. J. Syst. Bacteriol., 28: 20-26, (1978).
9. Koneman, E., Allens, S., Doweel, V.R. y Sommers, H.: Diagnóstico microbiológico, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1983.
 10. Little, T.H.: Haemophilus infections in pigs. Vet. Rec., 87: 399-402, (1970).
 11. Matthew, P.R. and Pattison, I.H.: The identification of Haemophilus-like organism associated with pneumonia and pleurisy in the pig. J. Comp. Pathol., 71: 44-52, (1961).
 12. Medina, A.G., Ponce, C., Torres, O., Camacho, J., Ciprian, A., y Pijoan, C.: Serotipificación de Haemophilus pleuropneumoniae aislados en el rastro de Ferrería, D.F., Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1985, 59, UNAM-SARH, Palo Alto, D.F. (1985).
 13. Myrlea, P.J., Fraser, G. and MacQueen, P.: Pleuropneumonia in pigs caused by Haemophilus parahaemolyticus. Aust. Vet. J., 50: 255-259, (1974).
 14. Nicolet, J. and Scholl, E.: Haemophilus infections, diseases of swine, 5th ed. Edited by: Leman, A.D., Glock, R.D., Mengeling, W.L., Penny, R.H.C., Sholl, E., Straw, B., 368-375, The Iowa State University Press. Ames, Iowa, 1981.
 15. Nielsen, R. and Mandrup, M.: Pleuropneumonia in swine caused by Haemophilus parahaemolyticus. A study of epidemiology of infection. Nord. Vet. Med., 29: 465-473,

- (1977).
16. Nielsen, R.: Haemophilus pleuropneumoniae Infection in Pig, State Veterinary Serum Laboratory, Copenhagen, Denmark, 1982.
 17. Nielsen, R.: Serological characterization of Haemophilus pleuropneumoniae (Actinobacillus pleuropneumoniae) strains and proposal of a new serotype: Serotype 10. Acta. Vet. Scand., 26: 581-585 (1985).
 18. Nielsen, R.: Haemophilus pleuropneumoniae Diagnosis, Immunity and control, Annual Meeting of the American Association of Swine Practitioners, Des Moines, Iowa, 18-22, Sigler Printing, Ames, Iowa, (1985).
 19. Pittman, M.: A classification of the hemolytic bacteria of the genus Haemophilus, Haemophilus haemolyticus Bergey et al., and Haemophilus parahaemolyticus nov. spec. J. Bacteriol., 64: 750-751, (1953).
 20. Pijoan, A.C., Ochoa, U.G. y Méndez, M.D.: Aislamiento de Haemophilus parahaemolyticus de cerdos con neumonia. Tec. Pec. Mex., 34: 85-87, (1978).
 21. Pijoan, C. y Ramirez, R.: Haemophilus, Diagnóstico de las Enfermedades del Cerdo. Editores: Ramirez, R., Pijoan, C., 515-519, Talleres de Litográfica Cultural. México, 1982.
 22. Pohl, S., Bertschinger, H.V., Frederiksen, W. and Mannheim, W.: Transfer of Haemophilus pleuropneumoniae and the Pasteurella hemolytica-like organisms causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae comb. nov.) on the basis

- of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int. J. Syst. Bact. 33: 510-514 (1983).
23. Rosendal, S., Mitchell, W.R. and Weber, M.: Haemophilus pleuropneumoniae. Lung lesions induced by sonicated bacteria and sterile cultures supernatant, in proceedings. Int. Pig Vet. Soc. Congress., 5: 221, (1980).
 24. Rovozzo, G.C. and Burke, C.N.: A Manual Basic Virological Techniques, Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1973.
 25. Rusing, H.J.: Vaccination against Haemophilus pleuropneumoniae infections in pigs, in proceedings. Int. Pig Vet. Soc. Congress, 5: 229, (1980).
 26. Sanford, S.E. and Josephson, G.K.A.: Porcine Haemophilus pleuropneumoniae epizootic in Southwestern Ontario: clinical, microbiological, pathological and some epidemiological findings. Can. J. Comp. Med., 45: 2-7, (1981).
 27. Sebunya, T.N., Saunders, J.R. and Osborne, A.D.: Characteristics of Haemophilus pleuropneumoniae isolates and some epidemiological findings on porcine Haemophilus pleuropneumoniae in Saskatchewan. Can. Vet. J., 23: 224-228, (1982).
 28. Sebunya, T.N. and Saunders, J.R.: Pulmonary clearance of Haemophilus pleuropneumoniae and Serratia marcescens in mice. Am. J. Vet. Res., 43: 1799-1801, (1982).
 29. Sebunya, T.N. and Saunders, J.R.: Haemophilus pleuropneumoniae infection in swine: A review. J. Am. Vet. Med. Ass. 182: 1331-1337, (1983).

30. Schiefer, B., Moffatt, R.E. and Greenfield, J.: Porcine Haemophilus parahaemolyticus pneumonia in Saskatchewan. 1. Natural caoncurrences and findings. Can. J. Comp. Med., 38: 99-104, (1974).
31. Shope, R.E.: Porcine contagious pleuropneumonia. 1. Experimental transmission, etiology and pathology. J. Exp. Med., 119: 357-358, (1964).
32. Zinnemann, K.: Report of the sucommittee on the taxonomy of Haemophilus (1962-1966). Int. J. Syst. Bacteriol., 17: 165-166, (1967).
33. Zinnemann, K.: International committe on nomenclature of bacteria, subcommittee on taxonomy of Haemophilus (Minutes meeting august 1970). Int. J. Syst. Bacteriol., 21: 132-133, (1971).