

66
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*
Y SEROLÓGICO CON PLEUROTTEST SEROTIPOS 1,2,3,5,7 y 9
CON MUESTRAS OBTENIDAS DE RASTRO**

Tesis que para obtener el título de:

QUIMICO FRMACÉUTICO BIÓLOGO

Presenta:

OSCAR TORRES ANGELES

Directores: Dr. JOSÉ ABEL CIRPIÁN CARRASCO

Dr. SUSANA MENDOZA ELVIRA

Cuautitlán izcalli, Estado de México.

1995

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

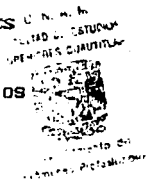
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEG-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estudio microbiológico de Actinobacillus pleuropneumoniae y serológico con Pleurotest serotipos 1, 2, 3, 5, 7 y 9 con muestras obtenidas de rastro.

que presenta el pasante Oscar Torres Angeles
con número de cuenta: 7540758-2 para obtener el TITULO de
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 31 de Agosto de 1995

PRESIDENTE	<u>Dr. Abel Ciprián Carrasco</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Andrés Romero Rojas</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Víctor M. Zendejas Buitrón</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Stella Maris Reginensi Rivera</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Sofia González Gallardo</u>	

UAR/DEP/VAP/02

FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A mi padre Miguel Torres García por su apoyo y confianza que siempre me ha brindado a través de los años y por todos sus esfuerzos para que yo pudiera realizar esta meta, por ser un amigo en el que se puede apoyar en todas las situaciones y problemas dándonos su experiencia y por todas sus enseñanzas.

A mi madre Simona Angeles Barrera por todo el cariño que me ha brindado por su comprensión, apoyo y desvelos, por ser una amiga con la que se puede contar siempre.

A mis hermanos Miguel Angel, Herlinda, Eduardo, Ma. del Pilar, Lucía y Elvia por su apoyo y comprensión

A mis cuñados Leonor, David, Eva, Manuel y Juan por su apoyo.

A mi padrino José Cervantez por todo su apoyo.

A Carlos Ponce y familia por la amistad que siempre me han brindado durante todo este tiempo.

A la cDr. Susana Elisa Mendoza Elvira por su amista y apoyo durante mi formación profesional, por su labor para la realización de el presente trabajo.

Al Dr. Abel Ciprián Carrasco por todos sus consejos, amistad y apoyo.

Al cDr. Andrés Romero Rojas por su amistad y apoyo

A los miembros del Jurado M. en C. Víctor Cendejas Buitrón, M. en C. Stella Regines Rivera y M. en C. Sofía González Gallardo por su colaboración en la revisión de este trabajo.

**Con amor y cariño para Gloria Leticia
Arellano Martinez por su apoyo y amor que
me ha brindado y que sin su esfuerzo no
hubiera podido alcanzar esta meta.**

El presente trabajo se realizo en el laboratorio de Virología de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ÍNDICE

	Pág.
Resumen.....	I
Lista de cuadros.....	II
Glosario.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Historia.....	1
1.3. Características morfológicas y bioquímicas.....	2
1.4. Origen y efecto de las neumonías.....	2
1.5. Distribución geográfica.....	3
1.6. Epidemiología.....	6
1.7. Morbilidad y mortalidad.....	6
1.8. Transmisión.....	6
1.9. Patogenia.....	7
1.9.1. Factores de Patogenicidad.....	7
1.9.1.1. Cápsula.....	7
1.9.1.2. Fimbrias Citoaderentes.....	8
1.9.1.3. Lipopolisacárido (LPS).....	9
1.9.1.4. Proteínas de Membrana Externa.....	10
1.9.1.5. Exotoxinas.....	10
1.9.1.6. Proteasas.....	12
1.10. Signos Clínicos.....	12
1.10.1. Lesiones a la Necropsia.....	14
1.10.2. Lesiones Microscópicas.....	15
1.11. Diagnóstico.....	15
1.11.1. Diagnóstico Diferencial.....	15
1.11.2. Métodos de Diagnóstico.....	16
1.11.3. Pruebas Serológicas.....	17

1.11.3.1. Prueba de Fijación del Complemento. (FC).....	17
1.11.3.2. Prueba de Enzima Ligada a Inmunoabsorbente (ELISA).....	18
1.11.3.3. Pruebas de Aglutinación.....	18
1.11.3.3.1. Aglutinación en Tubo.....	18
1.11.3.3.2. Aglutinación en Tubo con 2-Mercapto-etanol (2-Me-TA).....	19
1.11.3.3.3. Prueba de Aglutinación con Partículas de Látex.....	19
1.11.3.3.4. Prueba de la Neutralización de la Hemolisina.....	19
1.12. Situación del Diagnóstico en México.....	20
1.13. Pleurotest.....	21
1.13.1. Explicación de la Prueba.....	21
1.13.2. Principios del Procedimiento.....	22
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Muestras.....	24
3.1.1. Lugar de Muestreo.....	24
3.1.2. Marcaje de los Animales.....	24
3.1.3. Recolección de las Muestras.....	24
3.2. Procesamiento de las Muestras.....	24
3.2.1. Sueros.....	24
3.2.2. Pulmones.....	25
3.2.3. Aislamientos.....	25
3.2.4. Serología.....	25
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Muestras.....	29
4.2. Aislamientos.....	29
4.3. Serología.....	31
5. DISCUSIÓN.....	35
6. CONCLUSIONES.....	38
7. REFERENCIAS.....	39

RESUMEN

La neumonía producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en los cerdos es un problema que ocasiona grandes pérdidas económicas para los porcicultores por el gran número de animales que se pierden en un brote ya que la mortalidad es alta, además de los altos costos de mantenimiento de los animales que sobreviven a la infección. Por tal razón el establecer la relación entre el agente causal con la presencia de anticuerpos en los animales es de gran importancia para así poder implementar métodos de diagnóstico rápidos, confiables y sencillos. Para conocer dicha relación se emplea el aislamiento de los microorganismos a partir de los órganos afectados y la detección de anticuerpos en el suero de los animales por pruebas serológicas.

Para éste trabajo se realizaron visitas semanales al rastro de Tlalnepantla con el fin de obtener muestras de sangre y pulmón del mismo animal sacrificado y previamente se había marcado con un arete numerado para identificarlo. Se muestrearon 250 animales de los cuales se colectaron 198 muestras de sangre y pulmón, las 52 muestras restantes solo fueron de sangre ya que los aretes se perdieron durante el proceso de sacrificio.

Los pulmones fueron clasificados en 4 grupos en base a las lesiones macroscópicas que presentaron: Grupo I Consolidación Fibrino-hemorrágica (CFH), Grupo II. Consolidación Gris-rojiza (CGR); Grupo III. Sin Cambios Patológicos Aparentes (SCPA); Grupo IV. No Definida (ND). De los 198 pulmones colectados 70 (35.35%) presentaron lesión CFH, 45 (22.72%) fueron del tipo CGR, 51 (25.75%) SCPA y 32 (16.16%) no se pudieron clasificar (ND).

Los microorganismos que se aislaron de las muestras de pulmón fueron: *Pasteurella multocida* agente responsable de la CGR, *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 1 y 2 de la CFH, en la mayoría de los SCPA no se logro el aislamiento y en los de lesión ND se encontraron una gran variedad de agentes entre los que podemos mencionar, *Streptococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *Bacillus* sp. entre otros.

Los sueros de las muestras de sangre se enfrentaron a los antígenos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 5, 7 y 9 del kit PLEUROTTEST obteniendo resultados positivos al 1 y 9 principalmente.

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1.- Relación de los serotipos y países de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> reportados a nivel mundial	4
Cuadro 2.- Distribución de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en los diferentes Estados de la República Mexicana.....	5
Cuadro 3.- Antígenos somáticos encontrados en <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y los serotipos que los presentan.....	11
Cuadro 4.- Factores de patogenicidad asociados con <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	13
Cuadro 5.- Características bioquímicas de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	27
Cuadro 6.- Características bioquímicas de <i>Pasteurella multocida</i>	28
Cuadro 7.- Relación de los grupos formados con el número de pulmones.....	30
Cuadro 8.- Microorganismos aislados relacionados con la lesión que presentaron los pulmones.....	30
Cuadro 9.- Resultados negativos a la prueba PLEUROTTEST relacionados con los aislamientos.....	33
Cuadro 10.- Resultados positivos a la prueba PLEUROTTEST relacionados con los aislamientos	33
Cuadro 11.- Serotipos identificados con PLEUROTTEST relacionados con la lesión y los agentes aislados.....	33
Cuadro 12.- Relación de los serotipos de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> determinados en un mismo suero con PLEUROTTEST.....	34

GLOSARIO

A.p. bio 1	=	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biovariedad 1
A.p. bio 2	=	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> biovariedad 2
BHI	=	Infusión de Cerebro Corazón
CFH	=	Consolidación Fibrino - Hemorrágica
CGR	=	Consolidación Gris - Rojiza
cm ³	=	Centimetro Cúbico
CO ₂	=	Dioxido de Carbono
DNA	=	Acido Desoxiribonucleico
ELISA	=	Ensayo de Inmunoabsorbente Ligado a Enzima.
FC	=	Fijación de Complemento
IFA	=	Anticuerpos Fluorescentes Indirectos
IgA	=	Inmunoglobulina "A"
IgA1	=	Inmunoglobulina "A" subclase I
IgG	=	Inmunoglobulina "G"
IgM	=	Inmunoglobulina "M"
Kd	=	Kilodaltones
LPS	=	Lipopolisacárido
LOS	=	Lipooligosacárido
ml	=	mililitro
2-Me-TA	=	Aglutinación en Tubo con 2-mercapto-etanol
NAD	=	Nicotinamin Adenosin Dinucleotido
ND	=	No Definido
PCP	=	Pleuroneumonia Contagiosa Porcina
P.m.	=	<i>Pasteurella multocida</i>
PMN	=	Polimorfonucleares
SCPA	=	Sin Cambios Patológicos Aparentes
SFF	=	Libre de Patógenos Específicos
UFC	=	Unidades Formadoras de Colonia

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP) es una enfermedad devastadora, la enfermedad puede variar desde un curso hiperagudo hasta el crónico, en donde la lesión aguda característica es una neumonía hemorrágica necrosante, asociada a una pleuritis fibrinosa, mientras que la lesión crónica se distingue por un tejido pulmonar consolidado, infartado y encapsulado (87, 80).

La neumonía en el cerdo representa uno de los más graves problemas infecciosos de esta especie. Típicamente entre el 30-60% de los cerdos de abasto presentan alguna lesión neumónica (54). El costo de esta enfermedad para la industria porcina es alto, principalmente cuando la enfermedad se presenta en forma crónica lo que ocasiona pérdidas económicas considerables por el retraso en el crecimiento y una deficiente conversión alimenticia. Se ha demostrado que por cada 10% de tejido pulmonar afectado, el cerdo sufre un retraso en el crecimiento (medido por su ganancia diaria de peso) del 5% lo que provoca que el animal se retrase en salir al mercado un tiempo de 2 a 5 semanas. (96)

1.2. HISTORIA

En 1963, Olander (en California, EUA) aisló una bacteria de cerdos con problemas neumónicos, la cual requería para su crecimiento el factor V (nicotinamin adenosin dinucleótido: NAD) y producía una marcada hemólisis en el agar sangre por lo que se le denominó *Haemophilus parahemolyticus* (69).

Ese mismo año Shope (en Argentina) investigó un brote de pleuroneumonía de tipo agudo en cerdos y se denominó *Haemophilus pleuropneumoniae* (93). Después de una serie de estudios a estas bacterias se llegó a la conclusión que ambas bacterias eran idénticas siendo más aceptado el nombre de *Haemophilus pleuropneumoniae*

En la actualidad en base a estudios de hibridación de DNA la bacteria *Haemophilus pleuropneumoniae* se ha reubicado en el género de los *Actinobacillus* denominándosele *Actinobacillus pleuropneumoniae* (79). Por otro lado, en base a los requerimientos de NAD para

su crecimiento se han definido dos biovariedades, la biovariedad 1 que requiere este factor y la biovariedad 2 que no lo requiere (89).

1.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

Actinobacillus pleuropneumoniae es una bacteria del tracto respiratorio con una alta especificidad a su hospedero (el cerdo), es una bacteria pleomórfica que se observa generalmente como pequeños bastones Gram negativos, capsulados, de aproximadamente 0.5 a 1.5 μm de largo por 0.3 μm de diámetro, inmóviles, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, crecen en medios enriquecidos que contienen factor V (NAD), pero no requieren del factor X (hemina) (7, 42) Por su necesidad del factor V crecen en la proximidad de colonias de *Staphylococcus aureus*, fenómeno que se conoce como crecimiento satélite o satelitismo. Fermenta la mayoría de los carbohidratos, excepto sorbitol, dulcitol y meso-inositol, no utiliza los citratos, no produce ácido sulfhídrico, ni indol, degrada la urea y los nitratos, presenta reacción dudosa a la catalasa y oxidasa.

La existencia de varios serotipos de esta bacteria fue determinada por los estudios de aglutinación cruzada de Nicolet (60) el cual definió tres serotipos basándose en los antígenos de tipo específicos asociados a la cápsula (lábil y resistentes al calor). Esta clasificación fue ampliada por Gunnarson (25) quien descubrió los serotipos 4 y 5; y Nielsen (65) y Rosendal (84) quienes propusieron la existencia de los serotipos 6 y 7 respectivamente. En la actualidad se reconocen mundialmente 12 serotipos (67)

1.4. ORIGEN Y EFECTO DE LA NEUMONIA.

Entre los factores que predisponen a los problemas respiratorios se encuentran los cambios bruscos de temperatura, malas condiciones de higiene, estrés debido al manejo y adquisición de nuevos animales. Algunos autores consideran que el factor más importante es la densidad de la población animal (36,90) y otros estudios muestran que el manejo y el ambiente juegan un papel importante en la incidencia y gravedad de las neumonías (36).

La neumonía causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* es una enfermedad importante que produce un impacto económico significativo, teniendo como características en su forma crónica, la disminución de peso y una baja conversión alimenticia, lo que provoca mayor costo para los poricultores los animales que se mantienen vivos que los que mueren en forma aguda (36).

1.5. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La PCIP está ampliamente distribuida a nivel mundial, en Dinamarca se han encontrado casi todos los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (1,2,3,4,5,6,8,9,10,11 y 12) prevaleciendo el serotipo 2; en algunos otros países como Argentina, Irlanda, Rumania, Taiwan y Venezuela han identificado sólo un serotipo (1,8,5,5 y 7) respectivamente, mientras que en otros países no se ha reportado ningún serotipo (Cuadro 1).

En México a partir de 1976, se observaron violentas epizootias de neumonía en granjas porcinas del Bajío y del Estado de Tlaxcala. Estos casos se caracterizaron por la elevada morbilidad (80-90%) y mortalidad (10-30%), que inicialmente afectó a los cerdos adultos y con el tiempo se fue estableciendo como una infección enzoótica en los lechones (43). La enfermedad no respondió al tratamiento con antibióticos ni con inmunizantes comunes a base de pasteuras, estreptococos, corinebacterias y salmonelas (6).

Debido a la severidad de los casos en nuestro país, Pijoan y cols. (73) decidieron hacer un trabajo de investigación sobre la etiología de este problema. El estudio fue realizado en dos granjas localizadas en el Estado de Michoacán y Tlaxcala. Se sacrificaron 29 animales de edades entre 2 y 6 meses que presentaban signos avanzados de enfermedad respiratoria, 6 de la zona de Tlaxcala (43) y 23 de La Piedad Michoacán. En 3 (50%) de los pulmones provenientes de Tlaxcala y 5 (21.7%) de La Piedad, se obtuvo crecimiento de colonias beta hemolíticas que fueron clasificadas como *Haemophilus parahemolyticus* (*pleuropneumoniae*).

Ciprián y cols.(3) en un estudio realizado en 1988 en pulmones neumónicos provenientes de rastro aislaron *Actinobacillus pleuropneumoniae* encontrando que el serotipo predominante fué el 1 (3).

En otro trabajo realizado en el mismo año Díaz y cols.(10) reportaron la presencia de los serotipos 1,2,3,4,5,6,7,8 y 9. La distribución de los serotipos en el país se muestra en el cuadro 2.

CUADRO 1.- Relación de los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y los países en los que se han reportado a nivel mundial. (50)

PAIS	SEROTIPO PREVALENTES	SEROTIPOS DOMINANTES	REFERENCIA
Alemense	2,3,4,5,6,7,9,10	9,2,7	53, 88
Argentina	1,2,3,5	1	99
Australia	1,2,3,7	1	12
Bélgica	2,3,6,7,8,9,11,UT	3	29, 30
Brazil	1,3,4,5,UT	5	72, 71
Canadá	1,2,3,5,6,7,8,10,12	1,5	46, 82
Chile	1,5	1,5	70
Checoslovaquia	1,2,7	2	95
Dinamarca	1,2,3,5,6,7,8,10,11,12	2	68
España	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	4	16
Estados Unidos	1,3,5,7,8,9	1,5	13, 28, 81, 90
Francia	2,3,7,8,9	9	36
Holanda	1,2,3,5,7,8,9,11	2,9,11	32
Hungría	1,2,3,5,6,7,10,11,12	1,2	17, 32
Italia	1,2,3,4,5,7	5	44, 94
Irlanda	3, UT	3	80
Japón	1,2,3,5,6,7,8,9,12	1,2	8, 35, 19
Korea	2,3,5,7	5,2	101
México	1,2,3,4,5,6,7,8,9	1	3,10
Noruega	2	2	14
Polonia	1,2,3,9	1	31
Suiza	2,3,4	2	26
Suecia	2,3,7,9	2	64
Reino Unido	1,2,3,5,6,7,8,10	1,5	2, 31

UT = No Tipificables

CUADRO 2.- Distribución de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en los diferentes Estados de la República Mexicana. (4, 10)

ESTADO	SEROTIPOS IDENTIFICADOS POR AISLAMIENTO	SEROTIPOS IDENTIFICADOS POR SEROLOGÍA
Quintana Roo	1,4,5,9, (2,3)	1,2,3,5,7,9
Jalisco	1,2,3,5,8,9	1,2,3,5,7,9
México	1,5, (2)	1,2,3,5
Michoacán	1,5,6,7,8,9 (3)	1,3,5,7,9
Nuevo León	(1,3)	1,3
Puebla	1,2,3,4,5,9	1,3,5
Querétaro	1	1,5
Sinaloa	—	1,5
Sonora	1	1,5
Tlaxcala	1	1
Yucatán	5	1,3,5,7

() = Serotipos identificados recientemente.

1.6. EPIDEMIOLOGÍA

Actinobacillus pleuropneumoniae es transmitido por vía respiratoria, los animales enfermos crónicamente lo dispersan cuando son introducidos en piaras que no han tenido exposición previa y son los responsables de brotes severos con altos índices de mortalidad y morbilidad (61, 85, 87) Después de que sucede un brote es frecuente descubrir que nuevos animales fueron adicionados o que los ya existentes fueron movidos antes de la aparición de los primeros signos del brote. Lo más frecuente es que se compran nuevos animales, lo que implica un aumento de movimiento de los mismos aumentando el grado de infección (87, 76, 89) .

Los brotes han sido asociados con estrés, sobrepoblación, mala ventilación y alta humedad. Los portadores sanos han sido asociados con brotes que se presentan en piaras de ciclo cerrado (82).

1.7. MORBILIDAD Y MORTALIDAD

La evaluación de la morbilidad y mortalidad de los brotes mexicanos, se han caracterizado por los siguientes hechos:

- a.- Varía según la edad de los animales.
- b.- Puede alcanzar en el lote afectado hasta el 80%, en tanto que la mortalidad, aún con la administración de tratamiento puede ser hasta del 35 %.
- c.- La mayoría de los brotes detectados han sido en animales de 30 a 50 kg. de peso.
- d.- Ocasionalmente se difunde a animales adultos (43, 90).

1.8. TRANSMISIÓN

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

- a.- Se utilizan corrales o jaulas que permiten el contacto.
- b.- Se mezclan constantemente animales de diferentes grupos (89).

El brote se presenta subitamente y se detecta por la muerte de algunos cerdos en la granja.

El período de incubación de la enfermedad es corto, experimentalmente de menos de 6 hrs., aunque en condiciones de campo varía entre 12 y 24 hrs (89).

1.9. PATOGENIA

La patogenia exacta de *Actinobacillus pleuropneumoniae* es desconocida, sin embargo, se ha demostrado que se encuentran relacionados varios factores. Las investigaciones sugieren que la endotóxina es la responsable de los cambios patológicos iniciales y que las citolisinas son citotóxicas para los macrófagos alveolares, posteriormente los complejos antígeno-anticuerpo destruyen el endotelio vascular causando vasculitis y trombosis. Estos daños resultan en edema, infarto, necrosis, exaltación y hemorragia que son características de la PCP (11, 74, 87).

El tamaño del inoculo y el lugar donde se implante son también importantes en la patogenia de la enfermedad ya que los aerosoles que contienen al microorganismo de tamaño pequeño penetran más profundo alcanzando niveles alveolares lo cual favorece la infección, cuando esto sucede los macrófagos alveolares son destruidos por la endotoxina y la enfermedad se manifiesta. Por otro lado se ha demostrado que solo 100 células de *Actinobacillus pleuropneumoniae* son capaces de causar lesiones severas en los animales susceptibles (74, 76, 86).

1.9.1. FACTORES DE PATOGENICIDAD

1.9.1.1. CÁPSULA

La cápsula es la responsable de la especificidad del serotipo, en el presente se reconocen doce serotipos designados con números arábigos del 1 al 12. Los estudios sobre antígenos empleados para el diagnóstico serológico han demostrado que la cápsula es el más adecuado para tal propósito, debido a que la estructura química de ésta macromolécula es única en cada uno de los serotipos, excepto en el serotipo 5 que se ha subdividido en serotipos 5a y 5b (15).

Dentro de las propiedades biológicas de la cápsula se mencionan las siguientes: son inertes, no tienen actividad tóxica (como la reacción de Schwartzman), tampoco tiene actividad pirogénica.

Sin embargo, se ha encontrado que mata al embrión de pollo, presenta actividad blastogénica linfocitaria, debido a la carga negativa que le confiere la cápsula hay resistencia a la fagocitosis por neutrófilos (PMN), es opsonizado por los anticuerpos e interfiere con la actividad del complemento hacia la membrana (15, 9).

Los anticuerpos generados contra la cápsula, solo protegen contra la muerte, pero no contra las lesiones pulmonares y a la infección crónica. La virulencia atribuida a la cápsula es variable entre los diferentes serotipos, y aunque es requerida para que *Actinobacillus pleuropneumoniae* sea virulento, aún no se conoce por completo el papel patogénico de la cápsula (57).

1.9.1.2. FIMBRIAS CITOADHERENTES

En México se han realizado una serie de trabajos que mostraron que cuando se inocularon por nebulización con *Actinobacillus pleuropneumoniae* (en una cámara de aerosoles) a cerdos, conejos, ratones y cuyos, solo los cerdos se infectaron y murieron con inóculos que variaron de 2×10^4 hasta 2×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Estas evidencias muestran la alta especificidad de *Actinobacillus pleuropneumoniae* hacia el cerdo, sugiriendo probablemente, que el cerdo posee receptores específicos hacia el factor de adherencia de esta bacteria (62).

En otros estudios se han identificado en *Actinobacillus pleuropneumoniae* estructuras semejantes a fimbrias o pilis citoadherentes, denominados adhesinas. Sin embargo, no se han encontrado estos apéndices extracelulares en *Actinobacillus pleuropneumoniae* cultivados *in vitro* y al parecer estos apéndices la bacteria solo los expresa en el cerdo. Se han identificado estas estructuras mediante microscopía electrónica y estudios de patogenicidad en cerdos libres de patógenos específicos (SPF), en donde se muestra que *Actinobacillus pleuropneumoniae* tiene y presenta factores de adherencia o pilis citoadherentes en cerdo, estos pilis sólo se mantienen en los primeros pasos de la bacteria en medios de cultivo *in vitro* (45).

Garibay y cols, en 1993 (20) encontraron fimbrias de un diámetro de hasta 2 nm, no obstante que también encontraron otras fimbrias de 2 a 7 nm de diámetro, lo cual sugiere que *Actinobacillus pleuropneumoniae* esta expresando dos clases de estructuras fimbriales que ya se habían encontrado en *Escherichia coli*, una "rígida" que tiene un diámetro de 2 a 5 nm y que esta

involucrada en la conjugación y la otra "flexible" con diámetro de hasta 2 nm, involucrada únicamente en la adherencia, al igual que en el estudio anterior estas estructuras se fueron perdiendo en los pasos subsiguientes.

1.9.1.3. LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

Las bacterias Gram negativas se caracterizan por presentar una membrana externa, que estructuralmente es idéntica a la membrana celular o interna, sólo que en la membrana externa o envoltura celular se encuentra enclavado el LPS. En *Actinobacillus pleuropneumoniae* se encuentra un antígeno somático denominado "O", situación que no ocurre con las bacterias del género *Haemophilus*, por lo que el término de LPS no se aplica, pero si el de lipooligosacárido (LOS) (22).

La estructura del antígeno "O" es variable entre los diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se componen principalmente de glucosa, galactosa, ramnosa, azúcares aminados como la N-acetilglucosamina y la N-acetilgalactosamina (15,45). El antígeno "O" es el responsable de las reacciones cruzadas entre los serotipos 1,9 y 11 porque comparten el mismo antígeno "O:1", el serotipo 2 el antígeno somático "O:2"; con respecto a los serotipos 3, 6, y 8 estos comparten el mismo antígeno "O:3"; lo mismo sucede con el serotipo 4 que cruza con el 7 porque comparten el antígeno "O:4"; en el caso del serotipo 5 (5a y 5b), este posee el antígeno "O:5"; mientras que el serotipo 10 posee el antígeno "O:6" y el serotipo 12 el "O:7" (Cuadro 3).

Las propiedades biológicas del LPS se resumen en las siguientes actividades: tiene la actividad biológica clásica de una endotoxina de los Gram negativos; el LPS de *Actinobacillus pleuropneumoniae* gelifica a los amebocitos del género *Limulus*, cuando se inocula por vía intradérmica se produce una reacción de Schwartzman, también el LPS actúa como un pirógeno. El LPS de los diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* induce una infiltración de células inflamatorias cuando se inocula a ratones y cerdos por vía respiratoria, observándose una neumonía intersticial multifocal y no la neumonía fibrinohemorrágica necrótica clásica de la PCP (4).

1.9.1.4. PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA

El perfil de las proteínas localizadas en la membrana externa se ha estudiado en todos los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, basándose en la movilidad electroforética de estas proteínas, la migración ocurrió de la siguiente manera: en las regiones de 39 a 44 kilodaltones (Kd); de 16 a 16.5 Kd y en la región de 29 Kd correspondiente a una proteína modificable por calor, por lo que se han identificado 7 patrones en nueve serotipos probados (21).

Las proteínas de la membrana externa de los serotipos 1 y 9 fueron idénticas (estos serotipos presentan reacción cruzada por sus antígenos somáticos), así como los serotipos 2 y 6 (estos serotipos no cruzan por sus antígenos capsulares), los serotipos 3,4,5,7 y 8 presentan perfiles diferentes (estos serotipos sólo cruzan por sus antígenos somáticos de la siguiente manera: el 3 con el 8, el 4 con el 7 y el 5 no cruza con los demás) (15).

1.9.1.5. EXOTOXINAS

En los sobrenadantes de los cultivos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se ha encontrado actividad tóxica sobre diferentes células, tales como linfocitos, macrófagos alveolares y principalmente, contra eritrocitos, esta actividad funcional ha determinado que a esos factores tóxicos se les denominen "hemolisinas" o "citolisinas". (58, 62)

Las toxinas que libera *Actinobacillus pleuropneumoniae* se han clasificado en la familia de toxinas denominadas RTx (Repeat of Toxin) y las producidas particularmente por este microorganismo se han designado como Apx (*Actinobacillus pleuropneumoniae* Rtx) (4).

Se han identificado tres distintos tipos de citolisinas en *Actinobacillus pleuropneumoniae*: citolisina I (antes ClyI, hoy ApxI), citolisina II (antes ClyII, hoy ApxII), citolisina III (antes ClyIII, hoy ApxIII). Se ha encontrado que la citolisina I la producen los serotipos 1,5,9,10, y 11; la citolisina II es excretada por todos los serotipos excepto el 10 y la citolisina III solo la producen los serotipos 2,3,4,6 y 8 (18, 33).

Estas hemolisinas no muestran diferencias antigénicas entre serotipos, aunque son antigénicamente diferentes entre ellas. La actividad hemolítica de esta proteína es probablemente

CUADRO 3 .- Antígenos somáticos encontrados en *Actinobacillus pleuropneumoniae* y los serotipos que los contienen. (4)

ANTIGENO	SEROTIPOS QUE LO PRESENTAN
O:1	1, 9, 11
O:2	2
O:3	3, 6, 8
O:4	4, 7
O:5	5a, 5b
O:6	10
O:7	12

la responsable de las lesiones iniciales de la PCP, caracterizadas por ser hemorrágicas y necróticas

1.9.1.6. PROTEASAS

El papel de las proteasas secretadas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* como un factor de patogenicidad ha sido poco estudiada. Kilian (34) demostró la presencia de proteasas capaces de romper la inmunoglobulina IgA en un trabajo en el cual estudio 37 cepas de *Haemophilus*, encontrando que sólo las cepas de *Haemophilus influenza* y de *Haemophilus aegyptus* son capaces de producir la proteasa capaz de romper a la IgA. Dos cepas de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* fueron capaces de degradar la IgA1 secretoria porcina, pero no degradaban la IgA secretoria humana.

Los factores de patogenicidad de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se resumen en el Cuadro 4.

1.10. SIGNOS CLÍNICOS

La muerte súbita sin signos clínicos o lesiones externas es común en los casos hiperagudos en las infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la muerte súbita ocurre generalmente en cerdos en buenas condiciones. Si los signos clínicos se observan estos incluyen fiebre alta, apatía, anorexia y un estrés respiratorio severo, diarrea acuosa, vómito y epitaxis puede ocurrir, especialmente como fase terminal o subterminal (61, 87, 11.)

Los signos clínicos de la fase aguda son respiración por el hocico, disnea, tos, depresión, fiebre y anorexia. Una alta mortalidad es común y una morbilidad también es alta en los cerdos que no han tenido exposición previa al *Actinobacillus pleuropneumoniae* y las infecciones se vuelven enzooticas en los animales que se recuperan de la fase aguda (61, 85, 87).

Los signos clínicos de la fase subaguda o crónica de la enfermedad no son específicos: los cerdos pueden tener poca fiebre o no presentarla, disminuye su apetito, disminuye su ganancia de peso y rara vez mueren. Las infecciones subclínicas son comunes, resultando en una baja conversión alimenticia, baja la tasa de crecimiento, retarda su comercialización e incrementa los costos de producción (61,1).

CUADRO 4. - Factores de patogenicidad asociados con *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (39)

ESTRUCTURA CELULAR O MOLECULAR	FUNCION	COMPOSICION	REFERENCIA
Fimbrias	Adhesion	Proteinas	55
Capsula	Evacion de la fagocitosis	Poliacetido	24
Hemolisinas o citolisinas	Lisis de eritrocitos	Proteinas	6,8
Proteinas de membrana externa	Choque endotoxico	Lipopolisacrido	51
Receptores	Captador de hierro	Proteinas	20
Proteinas	Degradacion de IgA	Proteinas	28,36

FALLA DE ORIGEN

La inspección en rastro de las piaras con infecciones subclínicas revelan un alto decomiso de las carcasas y una alta incidencia de lesiones crónicas pulmonares y pleuritis crónica.

Manifestaciones no respiratorias de *Actinobacillus pleuropneumoniae* son reportadas pero no son comunes, estas incluyen abortos en el tercer trimestre y parálisis causada por abscesos pleurales comprimiendo el canal vertebral y comprimiendo la médula espinal (91, 1, 97, 85).

1.10.1. LESIONES A LA NECROPSIA

Lesiones características postmortem de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en los cerdos son encontradas en el tracto respiratorio y en la cavidad torácica. Las cavidades pleural y pericardial pueden contener hasta 2 litros de líquido serosanguinolento y exudado fibrinoso amarillento. Las lesiones pulmonares generalmente son bilaterales y difundidas a través del pulmón. Los lóbulos apical, cardíaco y el aspecto cianiodorsal del lóbulo diafragmático generalmente están involucrados (61, 91, 39, 92).

En un estudio donde los cerdos fueron infectados con un aerosol de *Actinobacillus pleuropneumoniae* los lóbulos diafragmáticos fueron más severamente afectados que los otros.

En los casos agudos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* las lesiones son hemorrágicas, fibrinosas y necróticas. Una acumulación de fibrina, edema y hemorragia son encontrados en los espacios pleurales y subpleurales. Los lóbulos afectados están edematosos generalizados con áreas rojo oscuro de consolidación (92).

Pleuritis, necrosis y adherencias son características en los animales infectados crónicamente. Las lesiones pulmonares son oscuras, menos rojizas, firmes, más necróticas que las lesiones en los animales infectados agudamente y están bien delimitadas por tejido conectivo, aumento de volumen y edema de los nódulos submandibulares, bronquiales, cervicales, mediastínicos y pulmonares son las lesiones comunes postmortem. La tráquea y bronquios están llenos de espuma, líquido sanguinolento y fibrina (61, 91, 86, 1).

1.10.2. LESIONES MICROSCÓPICAS

Las lesiones microscópicas de los pulmones infectados en forma aguda con *Actinobacillus pleuropneumoniae* son lesiones típicas de una pleuroneumonía aguda, necrotizante y fibrinohemorrágica. Los capilares alveolares están dilatados y llenos de eritrocitos, trombocitos y ocasionalmente trombos de fibrina. Las paredes vasculares y el canal vascular pulmonar están necrotizados y están asociados con edema inflamatorio, exudado serofibrinoso y células mononucleares (11, 1)

El septo interlobular y los bronqueolos presentan infiltración con macrófagos, linfocitos, edema, fibrina y sangre. Los alvéolos contienen sangre, edema, fluido con alto contenido de proteínas y células epiteliales alveolares exfoliadas. El parénquima pulmonar está congestionado con infiltración y exudación de células mononucleares. Hay pequeñas áreas de necrosis coagulante con isquemia de ambos lóbulos (91, 80, 66, 37).

1.11. DIAGNÓSTICO

1.11.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Los casos hiperagudos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* deben ser diferenciados de otros casos de muerte repentina de cerdos jóvenes en buenas condiciones, esto incluye el envenenamiento por sal, deficiencia de vitamina E/selenio, infecciones por *Haemophilus parasuis*, síndrome de estrés porcino, ulceración gástrica, síndrome hemorrágico intestinal, torción intestinal y salmonelosis sistémica. Todas estas condiciones excepto la respiratoria de *Haemophilus parasuis* son fácilmente diferenciables de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por las lesiones macroscópicas a la necropsia (62, 63).

Generalmente *Haemophilus parasuis* afecta otros sistemas causando artritis, pericarditis y meningitis. Los signos y la historia clínica junto con los resultados de la bacteriología y la histopatología son útiles para la elaboración del diagnóstico diferencial.

Los casos agudos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* tienen una historia clínica y las lesiones macroscópicas patológicas son sugestivas si no son "patognomónicas". Un diagnóstico tentativo puede ser elaborado e iniciar un tratamiento basado en las lesiones macroscópicas y la historia.

El aislamiento bacteriológico y la identificación son necesarios para confirmar el diagnóstico (23, 75).

Los casos agudos, subagudos o crónicos pueden ser diferenciados de otras causas de disnea, estrés respiratorio, tos y retraso en el desarrollo en los cerdos en etapa de crecimiento y finalización. Otros agentes o causas que pueden ocasionar cuadros similares pueden ser: *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus* sp, enfermedad de Aujeszky *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, influenza porcina, *Ascaris suum* y especies de *Metastrongylus*, pero no son los únicos. Usando los métodos de diagnóstico descritos anteriormente se puede diferenciar las infecciones de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de las mencionadas (62, 63).

1.11.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA LA PCP.

El diagnóstico definitivo de la PCP debe ser oportuno y rápido siendo esencial identificar los diferentes serotipos prevalentes en el país, para elaborar así los biológicos adecuados para el diagnóstico y la inmunización de los animales.

Para el diagnóstico de la PCP se emplean cuatro métodos:

- 1) Observación de los signos clínicos en el cerdo y en los de la zahurda.
- 2) Observación de las lesiones a la necropsia de los animales muertos de casos agudos o durante la inspección en los centros de abasto de los casos crónicos.
- 3) Aislamiento y tipificación del *Actinobacillus pleuropneumoniae* de los pulmones de los cerdos con problemas agudos o bien crónicos.
- 4) Diagnóstico serológico que se lleva a cabo en los cerdos vivos de las granjas.

El primer método no es confiable ya que solo los signos clínicos se presentan en cursos agudos de la enfermedad, mientras que de casos crónicos pasa inadvertida (4).

Para el estudio patológico se requiere de los servicios de un médico veterinario especialista en patología (4).

El aislamiento y tipificación del microorganismo tarda de 48 a 72 horas, además de que para hacerlo es necesario contar con un laboratorio de bacteriología y de personal calificado (23, 27).

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 y es más rápido. Este método se basa en la detección de anticuerpos en los cerdos con el fin de determinar el "status immune" de la granja y diferenciar aquellos cerdos que fueron vacunados de los infectados (4, 83).

Para el diagnóstico serológico de la PCP se cuenta con las siguientes pruebas:

- a) Aglutinación.- Aglutinación con partículas de látex, aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol, hemoaglutinación indirecta (48, 24).
- b) Fijación de complemento (57).
- c) Prueba de ELISA (62).

En algunos países, el diagnóstico de la PCP se lleva o se llevó a cabo mediante los cuatro métodos. Para establecer las medidas de control y erradicación de la enfermedad utilizan el diagnóstico serológico.

1.11.3. PRUEBAS SEROLÓGICAS

En general las pruebas serológicas no son de gran utilidad cuando se presentan los brotes agudos por *Actinobacillus pleuropneumoniae* pero son de gran ayuda para los estudios epidemiológicos. Los títulos de anticuerpos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* disminuyen rápidamente, de tal manera que títulos positivos indican una infección actual o una reciente. La severidad de las lesiones y la prevalencia de las lesiones crónicas puede influenciar la persistencia de los anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*. (89, 78, 56)

1.11.3.1. PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO (FC).

La prueba de fijación del complemento es la prueba más empleada para el diagnóstico serológico de las infecciones por *Actinobacillus pleuropneumoniae* detectando en esta prueba los anticuerpos del tipo IgG, ya que los anticuerpos del tipo IgM son inactivados previamente por el calentamiento a 60 °C. Los sueros de los animales que presenten un porcentaje de hemólisis

mayor al 30% se considerarán negativos y los que tengan una hemólisis menor al 30% se consideran positivos a la infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (40)

Esta prueba presenta algunos problemas técnicos como son: no diferencia a los animales vacunados de los que presentan la infección y se pueden presentar falsos positivos o negativos por la actividad anticomplementaria o procomplementaria que posee el suero de cerdo. Es una prueba demasiado complicada que ocupa muchos controles, además de que el suero no debe estar hemolisado y por lo tanto la toma de muestra sanguínea del cerdo deberá ser la adecuada (57).

1.11.3.2. PRUEBA DE ENZIMA LIGADA A INMUNOABSORBENTE (ELISA).

Para esta prueba se han desarrollado varias técnicas de obtención del antígeno que se emplea para la prueba pero por ninguna de ellas ha podido eliminar las reacciones cruzadas que se presentan entre los serotipos presentes en *Actinobacillus pleuropneumoniae* ni con *Actinobacillus suis*. Esta prueba detecta anticuerpos de la clase IgG por medio de un anticuerpo anti-IgG marcado con una enzima la cual generalmente es fosfatasa alcalina o peroxidasa. La interpretación se realiza marcando un valor de "corte" de densidad óptica siendo este valor el límite de diferenciación entre los animales infectados y los animales sospechosos (62, 100).

1.11.3.3. PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN

Las pruebas de aglutinación han sido de las más empleadas para la serotipificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La interpretación de estas pruebas se realiza de la siguiente manera (24):

- a) Son positivos los sueros de los animales que presenten cualquier grado de aglutinación y
- b) Son negativos aquellos que no muestren aglutinación.

1.11.3.3.1 AGLUTINACIÓN EN TUBO

Detecta la presencia de anticuerpos de la clase IgM e IgG. Para esta prueba se realizan diluciones desde 1:10 hasta 1:640. La interpretación de esta prueba puede ser graduada empleando cruces,

dependiendo del tamaño de los flocúlos que se formen, de + a 4+. El título se determina como la máxima dilución del suero que da una reacción de 2+. Los sueros que tienen un título de 1:10 o mayor son considerados positivos (48).

1.11.3.3.2. AGLUTINACIÓN EN TUBO CON 2 MERCAPTOETANOL (2-ME-TA).

Detecta los anticuerpos de la clase IgG debido a que este compuesto tiene la particularidad de romper los enlaces disulfuro que forman la cadena pentamérica de la IgM inactivándola. Esta prueba puede detectar los anticuerpos de los animales infectados, en un tiempo más corto después de la infección que la prueba de fijación de complemento, ya que la prueba de 2-ME-TA puede detectar un 80% de los animales infectados a las 3 semanas post infección mientras que la prueba de FC detecta solo el 33% (48).

1.11.3.3.3. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN CON PARTICULAS DE LÁTEX.

Esta es una prueba en la cual el antígeno (proteína o polisacárido) son adsorbidos sobre partículas de látex, la prueba detecta anticuerpos de la clase IgM e IgG y títulos de 1.8 o mayores son considerados positivos a la infección.

1.11.3.3.4. PRUEBA DE LA NEUTRALIZACIÓN DE LA HEMOLISINA

Se ha descrito una prueba de neutralización de la hemolisina, usando sobrenadante de *Actinobacillus pleuropneumoniae* como fuente de hemolisina. Esta prueba ha mostrado varias ventajas sobre las pruebas convencionales como serían: no son serotipo específicas, permiten diferenciar entre los animales vacunados de los no vacunados y tiene buena sensibilidad (4).

La prueba 2-ME-TA y ELISA han sido propuestas como pruebas serológicas para *Actinobacillus pleuropneumoniae* y son prometedoras para uso de rutina. Ambas pruebas 2-ME-TA o ELISA son altamente específicas y más sensibles que la prueba de FC. La prueba de ELISA es fácilmente

automatizable, además de ser más económica y requiere menos tiempo que la prueba de FC. Una desventaja de estas pruebas, es que se presentan reacciones cruzadas entre serotipos, pero esto no interfiere con su utilidad como prueba rápida de tamiz. Una mayor sensibilidad se puede obtener por el empleo de antígenos de cepas poliespecíficas para propósitos de tamizar y determinar la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en una piara. Si se obtienen resultados positivos con el antígeno poliespecífico, se pueden emplear antígenos mono-específicos para serotipificar (77).

Otras pruebas que también han sido usadas para la serotipificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* incluyen la prueba de precipitación en anillo (31), la contraelectroforesis (71), coagulación (47, 49) y la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFA). La prueba de IFA es rápida porque se realiza directamente sobre el tejido pulmonar y el cultivo no es requerido. Prácticamente en el campo pueden realizarse preparaciones fijadas y enviarse a un laboratorio de diagnóstico para las pruebas de serotipificación (82).

La serotipificación es importante porque la virulencia varía entre serotipos y las vacunas no proporcionan protección cruzada entre serotipos (31). En términos generales el conocer el serotipo específico involucrado, ayuda a establecer los programas de vacunación, además, la serotipificación también facilita los estudios epidemiológicos de transmisión y distribución de los organismos.

1.12. SITUACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE LA PCP EN MÉXICO.

En México, a partir del primer aislamiento de el agente responsable de la PCP en 1978 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), se ha reportado que en los cerdos que llegan a los mataderos o rastros, el 2.7 % de los pulmones observados presentan lesiones pleuroneumónicas producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, este serotipo es altamente patógeno y es el predominante en el país. El diagnóstico de la PCP en México, se limita solo a eso al diagnóstico y no a la evaluación del "status inmune" de la granja y prevención de la enfermedad.

En México para la identificación de la PCP se emplean el diagnóstico clínico, el patológico y el bacteriológico. 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 laboratorios equipados y recursos humanos capacitados (4).

1.13. PLEUROTTEST

La problemática acerca de la PCP expuesta anteriormente, motivó a Ciprián y cols. a desarrollar un paquete tecnológico con el fin de elaborar a nivel industrial equipos de diagnóstico serológico para la PCP, empleando tecnología sencilla y de bajo costo. Con la utilización de éstos equipos se podrá conocer el "*status immune*" de la granja respecto a la enfermedad y poder así establecer las medidas de control necesarias. El equipo de diagnóstico fué denominado PLEUROTTEST. (Proyecto ganador del premio CANIFARMA, sección veterinaria 1989).

PLEUROTTEST es una prueba de aglutinación en placa diseñada para la identificación directa de los anticuerpos capsulares de *Actinobacillus pleuropneumoniae* contenidos en el suero del cerdo de cualquier edad mediante un simple ensayo de aglutinación en placa que se realiza en unos minutos.

1.13.1. EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los cerdos cuando se infectan con *Actinobacillus pleuropneumoniae* desarrollan la PCP, 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* desarrolla una clase de anticuerpos propios de la vacunación.

PLEUROTTEST esta diseñado para diagnóstico *in vitro*, ofrece la única oportunidad de distinguir directamente en las granjas porcícolas, si un cerdo ha sido infectado con *Actinobacillus pleuropneumoniae* de campo y por lo tanto es portador de la PCP o si el cerdo está sano, esté o no vacunado contra la PCP, además no requiere de personal calificado para la interpretación de los resultados.

1.13.2. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba de PLEUROTTEST se basa en el principio de aglutinación directa. El suero de cerdo a evaluar 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.

En un cerdo sano el suero normalmente no contiene anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*, si se tratará de un cerdo vacunado contra la PCP el suero contiene anticuerpos específicos contra el inmunógeno que no reaccionan con el antígeno empleado para la elaboración del PLEUROTTEST, de tal forma que la aglutinación no se produce y no se observan grumos indicando resultado negativo.

La prueba de PLEUROTTEST se efectúa en un máximo de 10 minutos y podrá ser realizada por personal sin conocimientos técnicos.

2. OBJETIVOS:

2.1.- Establecer la correlación entre la presencia de lesiones a nivel pulmonar con la existencia de anticuerpos presentes en suero por el método de aglutinación en placa.

2.2.- Emplear el paquete de diagnóstico denominado PLEUROTTEST* para detectar anticuerpos contra los serotipos 1, 2, 3, 5, 7 y 9 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

(*MARCA REGISTRADA)

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MUESTREOS.

3.1.1. LUGAR DE MUESTREO.

Se realizaron visitas semanales al rastro de Tlalnepantla en un periodo comprendido de Enero a Marzo de 1995.

3.1.2. MARCAJE DE LOS ANIMALES.

A los animales se les colocó un arete numerado para identificarlos a lo largo de la línea de matanza.

3.1.3. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Al momento del sacrificio se colectó una muestra de sangre. Los animales fueron seguidos por la línea de matanza, se tomó una muestra de pulmón al momento de la evisceración, ambas muestras, sangre y pulmón, fueron identificadas con el número del arete que se le había colocado al cerdo. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Virología de la Coordinación de Estudios de Posgrado donde fueron procesadas.

3.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

3.2.1. SUEROS.

La muestra de sangre se dejó coagular, se centrifugó a 3000 rpm por 15 min. para obtener y separar la mayor cantidad de suero posible, los sueros se envasaron en viales de 5 ml de capacidad almacenándose a -70 °C para realizar posteriormente las pruebas serológicas.

3.2.2. PULMONES.

Las muestras de los pulmones se clasificaron en cuatro grupos en base a las lesiones macroscópicas que presentaron; lesiones que comúnmente se presentan en las neumonías de los cerdos; los grupos se definieron como sigue:

Grupo I.- Consolidación Fibrino-Hemorrágica (CFH)

Grupo II.- Consolidación Gris Rojiza (CGR)

Grupo III.- Sin Cambios Patológicos Aparentes (SCPA)

Grupo IV.- No Definido (ND)

3.2.3. AISLAMIENTOS.

Los pulmones ya clasificados (con lesión o sin lesión) se procesaron de la misma forma. Se realizó un corte (previa esterilización de la superficie pulmonar con una espátula al rojo vivo) de aproximadamente 1 cm³ sembrándose por la técnica de inpronta en agar infusión de cerebro corazón (BHI) suplementado con 5% de sangre de bovino. Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 hrs. en atmósfera que contenía 5% de CO₂, además se empleó una cepa de *Staphylococcus aureus* como fuente de NAD para el aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Las colonias sospechosas de *Actinobacillus* se resembraron en agar BHI suplementado con extracto de levadura fresca para su posterior identificación por pruebas bioquímicas y las sospechosas de *Pasteurella multocida* se purificaron en medio de agar soya tripticaseína. Las pruebas bioquímicas que se emplearon para la identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida* se enlistan en los Cuadros 5 y 6.

3.2.4. SEROLOGIA.

Para realizar las pruebas serológicas los sueros se descongelaron a temperatura ambiente y se enfrentaron a los antígenos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de los serotipos 1, 2, 3, 5, 7 y 9 de PLEUROTTEST*. El desarrollo de la prueba se realizó colocando una gota (0.03 ml) de suero,

con una gota (0.03 ml) de antígeno sobre placas de aglutinación y se homogenizó con la ayuda de un palillo de madera; la placa se tomó por las esquinas y se agitó suavemente con movimientos ondulatorios por 4 minutos después de los cuales se realizó la lectura siendo positivo cualquier grado de aglutinación. La reacción de aglutinación es estable pero se recomienda que la lectura se realice en los dos minutos siguientes después de finalizada la prueba.

CUADRO 5 - Características bioquímicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (4)

PRUEBA	RESULTADO
Asimilación con cepa probada	Positivo
Dependencia a NAD	Positivo
Dependencia a Hemeina	Negativo
Fermento de CAMP	Positivo
Hemólisis	Positivo
Catalasa	Dudosa
Oxidasa	Dudosa
Urea*	Positivo
Nitrato*	Positivo
Asido a patty de carbohidratos*	
Glucosa	Positivo
Maltosa	Positivo
Maltotri	Positivo
Fructosa	Positivo
Sorbitol	Negativo
Maltosa	Positivo
Dulcitol	Negativo
Meso-inositol	Negativo
Fermenta Alcalina*	Positivo
SDH*	
Sulfhidrico	Negativo
Indol	Negativo
Motilidad	Negativo
Citrato*	Negativo

* Suplementado con extracto de levadura fresco.

CUADRO 6 - Características bioquímicas de *Pasteurella multocida*.(4)

PRUEBA	RESULTADO
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Positivo
Hemólisis	Negativo
Crecimiento en agua MacConkey	Negativo
Indol	Positivo
Urea	Negativo
Acido a partir de carbohidratos:	
Glucosa	Positivo
Lactosa	Negativo
Mannitol	Variable
Sacarosa	Positivo
Xilosa	Variable
Maltosa	Negativo
Citrona	Negativo
Nitrito	Positivo
Gelatina	Negativo
Ornitina	Positivo

4. RESULTADOS

4.1. MUESTREOS

Se muestrearon 250 animales de los cuales se colectaron 198 muestras de pulmón y suero, de los 52 animales restantes sólo se colectaron las muestras de suero debido a que durante el proceso de matanza los aretes que se les colocaron se perdían o los trabajadores del rastro los quitaban y no se pudo identificar a los animales de los cuales se había tomado la muestra; dichos sueros no se consideraron para el presente estudio.

De los 198 pulmones colectados 70 (35.35%) presentaron lesión del tipo CFH, 45 (22.72%) del tipo CGR, 51 (25.75%) SCPA y 32 (16.16%) no se pudieron clasificar (Cuadro 7).

4.2. AISLAMIENTOS

De los 198 pulmones colectados se aislaron un total de 33 (16.6%) cepas de *Pasteurella multocida* correspondiendo 25 (12.6%) a los que presentaron lesión del tipo CGR y 8 (4.0%) a los del tipo CFH.

Se aislaron 53 (26.7%) cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 1 correspondiendo 8 (4.0%) a la lesión CGR, 41 (20.7%) a la CFH y 4 (2.0%) a SCPA. De *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 2 se aislaron 27 (15.16%) cepas siendo 4 (2.0%) de CGR, 7 (8.6%) de CFH y 6 (5.0%) de SCPA.

Los resultados de los aislamientos que se reportan como no definidos son los resultados de los pulmones que en los medios de cultivo presentaron una alta variedad de microorganismos entre los que se pueden mencionar: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. y los que presentaron contaminación con *Proteus* sp. entre otros. Los pulmones (23, 11.6%) en los cuales se presentó este tipo de crecimiento correspondieron a 3 (1.5%) al grupo CGR y 20 (10.1%) a los que presentaron lesión No Definida.

Por otro lado no se obtuvo crecimiento en 62 (31.3%) pulmones, 5 (2.5%) de lesión CGR, 4 (2%) de CFH, 12 (6.1%) de lesión No Definida y 41 (20.7%) de SCPA. Los resultados se resumen en el Cuadro 8.

CUADRO 7 - Relación de los grupos formados con el número de pulmones colectados.

GRUPO	TIPO DE LESION	No DE PULMONES	%
I	CFH	70	35.35
II	CGR	45	22.72
III	SCPA	51	25.75
IV	NO DEFINIDA	32	16.16
TOTAL		198	100

CFH = Consolidación Fibrino Hemorrágica; CGR = Consolidación Gris Rojiza; SCPA = Sin Cambios Patológicos Aparentes

CUADRO 8.- Microorganismos aislados relacionados con la lesión que presentaron los pulmones.

MICROORGANISMO	LESION				No DE ARVESTRAS	%
	CGR	CFH	SCPA	NO DEFINIDA		
F.m.	25 (12.6%)	8 (4.0%)	--	--	33	16.6
A.p.bio1	8 (4.0%)	41 (20.5%)	4 (2.0%)	--	53	26.7
A.p.bio2	4 (2.0%)	17 (8.6%)	6 (5.0%)	--	27	13.6
NO DEFINIDO	3 (1.5%)	--	--	20 (10.1%)	23	11.6
NO ABLAMIENTO	5 (2.5%)	4 (2.0%)	41 (20.7%)	12 (6.1%)	62	31.3
TOTAL	45 (22.6%)	70 (34.6%)	51 (27.7%)	32 (16.2%)	198	100%

F.m. = *Pasteurella multocida*; A.p. bio1 = *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 1; A.p. bio2 = *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 2; CFH = Consolidación Fibrino Hemorrágica; CGR = Consolidación Gris Rojiza; SCPA = Sin Cambios Patológicos Aparentes

4.3. SEROLOGÍA

Los 198 sueros se probaron con PLEUROTTEST preparado con los serotipos 1,2,3,5,7 y 9 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* dando resultado negativo 57 (28.7%) sueros, de los cuales 11 (5.5%) correspondieron a la lesión CGR, de los cuales 3 (1.5%) pulmones fueron positivos al aislamiento de *Pasteurella multocida*, 3 (1.5%) a aislamiento no definido y de 5 (2.5%) no se logró el aislamiento.

De los sueros de los animales que presentaron lesión CFH, 2 (1.0%) en los cuales se había aislado *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 2 ambos sueros fueron negativos a la prueba serológica.

Los sueros de los animales SCPA 24 (12.1%) dieron resultado negativo, 2 (1.0%) sueros pertenecientes a animales de los cuales se había aislado *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 2 del pulmón y de 22 (11.1%) pulmones no se logró el aislamiento

En el grupo de lesión No Determinada, 20 (10.1%) sueros fueron negativos a las pruebas serológicas obteniéndose en estos pulmones un crecimiento no definido (Cuadro 9)

Por otro lado, 141 (71.2%) sueros dieron resultados positivos a las pruebas serológicas, de los cuales 34 (17.1%) correspondieron al grupo de lesión CGR, aislandose de 22 (11.1%) pulmones *Pasteurella multocida*, de 8 (4.0%) *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 1 y 4 (2.0%) fueron positivos al aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 2.

De los 68 (34.3%) sueros que dieron un resultado positivo del grupo de lesión CFH, de 41 (20.7%) pulmones se aisló *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 1, de 15 (7.6%) se aisló *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 2, de 8 (4.0%) se aisló *Pasteurella multocida* y 4 (2.0%) fueron negativos al aislamiento.

De los 27 (13.6%) sueros que dieron resultado positivo del grupo SCPA, de 8 (4.0%) pulmones se aisló *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 1 y 2 (4 y 4 respectivamente) y de 19 (9.6%) no se logró el aislamiento

En el grupo de lesión No Determinada de los 12 (6.1%) sueros que dieron resultado positivo en ninguno de los pulmones de los animales se logró el aislamiento (Cuadro 10).

En la prueba serológica PLEUROTTEST contra los diferentes serotipos evaluados, se obtuvo un total de 374 resultados positivos, correspondiendo 111 al serotipo 1 de *Actinobacillus*

pleuropneumoniae, 6 al serotipo 2, 43 al serotipo 3, 40 al serotipo 5, 67 al serotipo 7 y 107 al serotipo 9.

Los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que se detectaron en los 34 sueros de los animales que presentaron en los pulmones lesión CGR 61 dieron resultados positivos, siendo 20 sueros positivos al serotipo 1, 10 al serotipo 3, 4 al serotipo 5, 8 al serotipo 7 y 19 al serotipo 9.

En los 68 sueros de los animales del grupo que presentó lesión pulmonar CFH, 179 dieron resultados positivos, correspondiendo 60 al serotipo 1, 3 al serotipo 2, 20 al serotipo 3, 14 al serotipo 5, 24 al serotipo 7 y 58 al serotipo 9.

En los 27 sueros de los animales del grupo SCPA se obtuvo 76 resultados serológicos positivos, 22 fueron positivos al serotipo 1, 3 al serotipo 3, 10 al serotipo 5, 19 al serotipo 7 y 22 al serotipo 9.

En los 12 sueros de los animales que presentaron lesión pulmonar No Definida, se presentaron 58 resultados positivos, 9 al serotipo 1 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 3 al serotipo 2, 10 al serotipo 3, 12 al serotipo 5, 16 al serotipo 7 y 8 al serotipo 9 (Cuadro 11)

Otro aspecto que se demostró con las pruebas serológicas es que un mismo suero contenía anticuerpos contra uno o más serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* encontrándose primordialmente anticuerpos contra los serotipos 1 y 9 (56 sueros, 39 7º%), en segundo término se encontraron anticuerpos contra los serotipos 1,3,5,7, y 9 (12 sueros, 8 5º%), en tercer lugar contra los serotipos 1,3,7,9 y 1,5,9 (11 sueros, 7 8% respectivamente) y las otras reacciones positivas contra los diferente serotipos en menor proporción. Los porcentajes estan referidos a el número total de sueros evaluados que fue de 141 (Cuadro 12)

CUADRO 9 - Resultados negativos a la prueba PLEUROTTEST relacionados con los aislamientos.

TIPO DE LESIÓN	MICROORGANISMO AISLADO	No DE AISLMIENTOS	PORCENTAJE	No DE SUEROS POSITIVOS A PLEUROTTEST
CGR	P. m.	3	1.3	11
	NO DEFINIDO	3	1.3	
	NO AISLAMIENTO	5	2.5	
CFH	A.p. bio 2	2	1.0	2
SCPA	NO AISLAMIENTO	22	11.1	24
	A.p. bio 2	2	1.0	
NO DETERMINADA	NO DEFINIDO	20	10.1	20
TOTAL		57	28.7	57

P.m. = *Pasteurella multocida*; A.p. bio 2 = *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 2; CFH = Consolidación Fibroso Hemorrágica; CGR = Consolidación Gris Rojiza; SCPA = Sin Cambios Patológicos Aparentes

CUADRO 10 - Resultados positivos a la prueba PLEUROTTEST relacionados con los aislamientos.

TIPO DE LESION	MICROORGANISMO AISLADO	No DE AISLMIENTOS	PORCENTAJE	No DE SUEROS POSITIVOS A PLEUROTTEST
CGR	P.m.	22	11.1	34
	A.p. bio 1	8	4.0	
	A.p. bio 2	4	2.0	
CFH	A.p. bio 1	41	20.7	68
	A.p. bio 2	15	7.6	
	NO AISLAMIENTO	4	2.0	
	P.m.	8	4.0	
SCPA	NO AISLAMIENTO	19	9.6	27
	A.p. bio 1	4	2.0	
	A.p. bio 2	4	2.0	
NO DETERMINADA	NO AISLAMIENTO	12	6.1	12
TOTAL		141	71	141

P.m. = *Pasteurella multocida*; A.p. bio 1 = *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 1; A.p. bio 2 = *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 2; CFH = Consolidación Fibroso Hemorrágica; CGR = Consolidación Gris Rojiza; SCPA = Sin Cambios Patológicos Aparentes

CUADRO 11 - Serotipos identificados con PLEUROTTEST relacionados con las lesiones y los agentes aislados.

TIPO DE LESION	MICROORGANISMO AISLADO DE PULMON	No DE SUEROS	No DE RESULTADOS POSITIVOS	SEROTIPOS DETERMINADOS					
				1	2	3	5	7	9
CGR	P.m.	34	61	20	0	10	4	8	19
	A.p. bio 2								
	A.p. bio 1								
CFH	A.p. bio 1	68	179	60	3	20	14	24	58
	A.p. bio 2								
	P.m.								
SCPA	A.p. bio 2	27	76	22	0	3	10	19	22
	A.p. bio 1								
NO DEFINIDA	NO DEFINIDA	12	58	9	1	10	12	16	8
TOTAL		141	374	111	6	43	40	67	107

P.m. = *Pasteurella multocida*; A.p. bio 1 = *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 1; A.p. bio 2 = *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedad 2

CUADRO 12.- Relación de los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* determinados en un mismo suero con PLEUROTEST.

SEROTIPOS						No de SEROS	PORCENTAJE
1	2	3	5	7	9		
-	-	-	-	-	-	56	39.7
-	-	-	-	-	-	12	8.5
-	-	-	-	-	-	11	7.8
-	-	-	-	-	-	11	7.8
-	-	-	-	-	-	8	5.7
-	-	-	-	-	-	6	4.3
-	-	-	-	-	-	6	4.3
-	-	-	-	-	-	5	3.5
-	-	-	-	-	-	4	2.84
-	-	-	-	-	-	3	2.1
-	-	-	-	-	-	3	2.1
-	-	-	-	-	-	3	2.1
-	-	-	-	-	-	1	2.1
-	-	-	-	-	-	3	2.1
-	-	-	-	-	-	2	1.4
-	-	-	-	-	-	1	0.7
-	-	-	-	-	-	1	0.7
-	-	-	-	-	-	1	0.7
-	-	-	-	-	-	1	0.7
-	-	-	-	-	-	1	0.7
TOTAL 121	6	43	40	59	117	141	100

5. DISCUSIÓN

Uno de los problemas que se presentó fue el muestreo ya que los aretes con los que se habían marcado a los animales, en muchas ocasiones eran eliminados por los trabajadores del rastro en el momento del sacrificio y evisceración perdiéndose un número considerable de muestras de pulmón, por lo que aunque se contaba con las muestras de sangre no se pudo relacionar con la presencia de los microorganismos que pudieran estar presentes en los pulmones.

Los microorganismos que se aislaron con mayor frecuencia fueron los típicos de cada lesión, es decir, los pulmones que presentaron lesión de tipo CGR son características de *Pasteurella multocida*, los de lesión CFH son lesiones típicas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, los de lesión No Definida presentaban lesión que no era clásica de ningún microorganismo y que pudieron ser debidas a cambios posmortem durante el sacrificio o a otro tipo de microorganismo que no pudimos identificar.

Los aislamientos que reportamos como No Definidos se debió a la población microbiana excesiva que no fue porque en los medios de cultivo el desarrollo de gran número de microorganismo no nos permitía diferenciar de que tipo eran ya que en algunas cajas se presentó crecimiento de *Proteus sp* y esto nos impidió realizar una identificación adecuada por lo menos hasta género.

La contaminación con *Proteus sp.* se puede deber a que durante el proceso de sacrificio y evisceración de los animales eran lavados con agua de la llave, o que durante el proceso del mismo los trabajadores encargados de abrir los animales en ocasiones llegaban a lesionar los intestinos y debido a que los animales se procesan colgados con la cabeza hacia abajo el contenido intestinal se esparcía por todas las vísceras del animal.

El aislamiento de uno o más microorganismos de un mismo pulmón se debió a que los principales agentes que se identificaron como *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, ambos son agentes primarios de infección pulmonar en los cerdos y generalmente se presenta una sinergia entre ambos para agudizar un cuadro respiratorio en los animales (39).

En el caso de los animales en que se encontró las dos biovariedades de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la dependiente e independiente de NAD. En un trabajo previo Lugo y cols. (41) reportaron la presencia de estos microorganismos en pulmones de animales de abasto, determinando que en las muestras que procesaron se podían encontrar ambas biovariedades.

Los aislamientos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* no se pudieron serotipificar por la falta de antisueros específicos contra los diferentes serotipos lo cual podría haber sido de gran ayuda para corroborar los resultados obtenidos en la serología.

En las muestras de pulmón en las cuales no se pudo aislar ningún microorganismo en el caso de los pulmones que presentaron lesión de tipo CGR la cual es clásica de *Pasteurella multocida* se puede deber a que los animales tenían las lesiones de cicatrización y por lo tanto no se encontraban en la fase activa de la enfermedad dando como resultado que los microorganismos ya no se encontrarán en los animales.

Para el caso de los pulmones que presentaron lesión de tipo CFH, la cual es clásica de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y que dieron resultado positivo en las pruebas serológicas puede deberse a que el agente causal se encontrara en otro tipo de órganos como son las tonsilas de los animales las cuales no se consideraron para el presente estudio y no podemos demostrar la presencia del agente en dichos órganos como lo determinó Kume y cols (35).

Los resultados de las pruebas serológicas en las cuales reportamos 374 positivos estos son debidos a que en un mismo suero se pueden encontrar anticuerpos en contra de uno o más serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* ya que se ha reportado que las infecciones con este agente son mixtas y generalmente involucran a uno o más serotipos (5, 38)

La presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* del serotipo 1 el cual es el mas predominante en el país, fue reportada por Ciprián y cols.(3) y Díaz y cols (10), quienes además demostraron la presencia de los serotipos 2,3,4,5,6,7,8, y 9 en el país por lo que los resultados concuerdan con el reporte de Díaz, ya que en este estudio se pudo detectar los anticuerpos en contra de los serotipos 2,3,5,7,y 9, estos hallazgos eran de esperarse, ya que la comercialización de pies de cria y verracos sin control sanitario, diagnóstico y cuarentena con los países del norte de America ha fomentado la entrada no sólo la entrada de animales para mejoramiento genético, además de nuevos serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y otras enfermedades que no se encontraban en el país.

La mayor parte de los resultados positivos fueron contra los serotipos 1 y 9 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* los cuales eran de esperarse ya que se ha demostrado que estos dos serotipos presentan reacción cruzada por compartir características antigénicas similares en cuanto a su antígeno "O: 1" (ver Cuadro 3) (98).

Hoy en día la serología juega un papel importante en el control de las enfermedades ya que cuando se efectúa se puede determinar que animales están colonizados por microorganismos

potencialmente patógenos, dado que en la mayoría de los casos los animales pueden ser portadores asintomáticos del agente causal infectando al animal sin causarle la enfermedad y la inmunidad que induzca no sea absoluta pudiendo colonizar a otro animal. Por este motivo en la actualidad se recomienda el empleo de perfiles serológicos, o también llamados seropérfiles los cuales se basan en la detección de que porcentaje de animales están enfermos y cuantos portadores sanos existen para establecer las medidas de control de las infecciones y posteriormente en un plazo de 3 a 6 meses se recomiendan realizar un nuevo perfil con el fin de evaluar si las medidas de control tomadas son efectivas o de lo contrario tomar otras que complementen las ya establecidas (53).

Para poder establecer los perfiles serológicos a nivel de campo es recomendable contar con pruebas rápidas de diagnóstico que permitan obtener resultados confiables para que el Médico Veterinario establezca las medidas preventivas adecuadas. El PLEUROTTEST presenta ciertas ventajas sobre otras pruebas de laboratorio ya que permite obtener resultados confiables en un mínimo de tiempo, no requiere equipo sofisticado, ni de personal calificado para poder realizar las pruebas, además, permite conocer que serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se encuentran presentes en las granjas y poder establecer programas de control como son la vacunación contra los serotipos presentes en cada granja y poder erradicar la enfermedad.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados previamente expuestos y discutidos se concluye que:

1. La relación de los agentes causales con las lesiones pulmonares fue del 82.8 % para el caso de pulmones que presentaron lesiones de CFH y el aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae*; el 55.6% para las lesiones de CGR y aislamiento de *Pasteurella multocida*; el 62.5% para las lesiones no definidas con aislamiento que no se pudieron identificar y el 62.5% para los pulmones SCPA y sin aislamiento de microorganismos. Esta relación fue bastante alta, ya que en la mayoría de los casos el tipo de lesión macroscópica que presentaron los pulmones coincidió con los aislamientos de los principales agentes que producen neumonías en los cerdos
2. *Actinobacillus pleuropneumoniae* puede ser aislado tanto de pulmones que presenten CFH (72.5%) como de otro tipo de lesiones tales como CGR (15%) y SCPA (12.5%).
3. Se logró el aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovariedades 1 y 2 y de *Pasteurella multocida* de muestras de pulmón sin que presentaran lesión.
4. Los anticuerpos contra los serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que predominaron en los cerdos de abasto fueron el 1, 9, 7, 3, 5 y 2 respectivamente.
5. El empleo del equipo PLEUROTTEST facilitó en gran medida el trabajo por la sencillez y rapidez de la misma, con lo que se pudieron detectar los anticuerpos presentes en los animales que llegaron al rastro.
6. La prueba PLEUROTTEST fue y puede ser una herramienta de gran apoyo para el establecimiento de los perfiles serológicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas porcícolas, lo que permitiera tomar decisiones sobre las medidas preventivas y de control para erradicar la PCP en nuestro País.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA³⁹

7. REFERENCIAS

1. Backstrom, L., Hoefling, D.C. (1982) "Respiratory diseases of swine." *Vet Clin. N. Amer Large Anim. Prac.* p. 259-276.
2. Bradreth, E.L., Smith, I.M. (1985) "Prevalence of pig heards affected by pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* in Eastern England." *Vet. Rec.* 117: 143-145.
3. Ciprián, C.A., Medina, A.G., 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: 205-210
4. Ciprián, C.A., Mendoza, E.S., Garcia, M.C. (1994) "Primer Ciclo Nacional de Afecciones Respiratorias del cerdo" F.E.S.-C, U.N.A.M., U.A.Y. México p 128
5. Cole, J.R. (1978) "*Haemophilus parahaemoliticus* associated with pleuropneumonia in Georgia." *Vet. Med. Small Anim Clin.* 73: 1444-1446.
6. Colmenares, G., Torres, O., Lara, V., Camacho, J., Alvarez, J., De la Garza, M., Ciprián, C. (1988) "Resistencia antimicrobiana no codificada por plásmidos en *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo I". *Vet. Méx.* 19: 315.
7. Cowan, S.T., Steel, J. (1974) "Manual para la identificación de bacterias de interes médico." 2th De Cambridge Univ. Press. 137-142.
8. Chan, C., Yamamoto, K., Konoshi, S., Ogata, M. (1978) "Isolation and antigenic characterization of *Haemophilus parahemoliticus* from porcine pneumonia. *Jpn J. Vet Sci.* 40: 103-107.
9. Devenish, J., Rosendal, S., Bosse, J.T. (1990) "Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." *Infect Immun.* 58: 3829.
10. Diaz, C., González, M., Jimenez, E., Sthepano, A. (1988) "Identificación de diferentes serotipos de *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* aislados en México de cerdos con pleuroneumonía de 1985 a 1988." *Vet. Méx.* 20: 157-160.
11. Didier, P.J., Perino, L., Urbance, J. (1984) "Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*: microbiological and pathological findings." *J.A.V.M.A.* 184: 715-719.
12. Eaves, L., Blackall, P.J. (1988) "Serological characterization of Australian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." *Aust. Vet. J.* 65: 379-381.

13. Fales, W.H., Morehouse, L.F., Mittal, K.R., Knudsen, C.B., Nelson, S.L., Kinter, L.D., Turk, J.R., Turk, M.A., Brown, T.P., Shaw, D.P. (1989) "Antimicrobial susceptibility and serotypes of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* recovered from Missouri swine." J. Vet. Diagn. Invest. 1: 16-19.
14. Falk, K., Hoie, S., Lium, B.M. (1991) "An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II. Enzootic pneumonia of pigs. Microbiological findings and their relationship to patomorphology." Acta Vet. Scand. 32: 67-77.
15. Fenwick, B. (1990) "Diagnóstico de pleuropneumonia porcina en el laboratorio." Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. AMVEC. 17
16. Ferri, E.E.R., Gutiérrez, C.B., Vazquez, J.A., Tascon, R.I., Garcia Peña, J.A., Fuentes, R. (1990) "Isolation and characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains from swine pneumonia and pleuropneumonia in Spain". Proc. 11th Int. Pig Vet. Soc. Cong. Lausanne, Switzerland. p. 29.
17. Fodor, L., Varga, J., Molnar, E., Hajtos, Y. (1989) "Biochemical and serological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from swine." Vte. Microbiol. 20: 173-180.
18. Frey, J., Nicolet, J. (1990) "Hemolysin pattern of *Actinobacillus pleuropneumoniae* J." Clin. Microbiol. 28: 232
19. Fukuyasu, T., Sakpurm, T., Saito, K., Ashida, K. (1991) "Serotyping and drug susceptibility of strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolated from pneumonic lungs of pigs." J. Jap. Vet. Med. Assoc. 44: 11-16.
20. Garibay, E.J., Ciprián, C.A., Mendoza, E.S., Gonzales, G.S., Hernandez-Baumgarten, E. (1993) "Apendices extracelulares en *Actinobacillus pleuropneumoniae* aislados de casos agudos de pleuropneumonia contagiosa porcina." XXVIII Congreso A.M.V.E.C. Cancun Quintanaro. p. 283.
21. Gerrlach, G.F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A.A., Wilson, P.J. (1992) "Characterization of two genes encoding distinct transferring binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates." Infect. Immun. 60: 3253.
22. Gerrlach, G.F., Anderson, C., Klashinsky, S., Rossi-Campos, A., Potter, A.A., Wilson, P.J. (1993) "Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (Oml A) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1". Infect. Immun. 61: 565.
23. Gilbride, K.A., Rosendal, S. (1983) "Evaluation of a selective medium for isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae*." Canad. J. Comp. Med. 47: 455-450.

24. Gunnarsson, A., Bibersten, E.L., Hurvell, B. (1977) "Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahemolyticus* (*pleuropneumoniae*): agglutination reactions." Am. J. Vet. Res. 39: 1111-1114.
25. Gunnarsson, A., Hurvell, B., Biberstein, E.L. (1977) "Serological studies of porcine strains of *Haemophilus pleuropneumoniae*: Antigenic specificity and relationship between serotypes." Am. J. Vet. Res. 39 (8): 1286-1292.
26. Gunnarsson, A. (1979) "Evaluation of different antigens in the complement-fixation test for the diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*parahemolyticus*) infections in swine." Am. J. Vet. Res. 40: 1564-1567.
27. Gunnarsson, A. (1979) "Serological studies on porcine strains of *Haemophilus parahemolyticus* (*pleuropneumoniae*): Extraction of type specific antigens." Am. J. Vet. Res. 40: 469-472.
28. Hoffman, L.J., Carballo, J.P., Henderson, L.M. (1985) "Clinical, bacteriologic and serologic features of *Haemophilus pleuropneumoniae* outbreaks in Iowa swine." Am. Assn. Vet. Lab. Diagn. 28th Ann. Proc. 211-224.
29. Hommez, J., Devriese, L.A., Cassimon, P., Castryck, F. (1988) "Serotypes and antibiotic sensitivity of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* strains isolated in Belgium." Vlaams Diergenesk. Tijdschr. 57: 46-52.
30. Hommez, J., Devriese, L.A., Cassimon, P., Castryck, F. (1990) "Slide precipitation a simple method of type *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae*." Vet Microbiol. 24: 123-126.
31. Hunter, D. y cols (1983) "Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolates using ring precipitate tests." Vet. Rec. 113: 158.
32. Kamp, M., Popma, J.K., Van Leengoed, L.A.M.G. (1987) "Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in Netherlands with emphasis on heterogeneity within serotype 1 and (preposed) serotype 9." Vet Microbiol. 13: 249-257.
33. Kamp, M., Popma, J.K., Anakotta, J., Smits, M. (1991) "Identification of haemolytic and cytotoxic proteins *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies." Infect. Immun. 59(9): 3079-3085.
34. Kilian, M. Mestecky, J. (1979) "Pathogenic species of the genus *Hemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease." Infect. Immun. 26: 143.

35. Kume, K. Nagano, I., Nakai, T. (1986) "Bacteriological, serological and pathological examination of *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in 200 slaughtered pigs." *Jpn. J. Vet. Sci.* 48: 965-970.
36. Landquist, J.O. (1974) "Animal and environment in the production patterning pigs." *Acta Vet. Scand. suppl.* 51.
37. Lazary, S. (1978) "Immune response to *Haemophilus parahemolyticus* (HP) infections in pigs. *In Vitro* test to detect sensitized cells in the blood of infected and vaccinated animals." *Vet. Micro.* 3: 143-145
38. Lewis, D.H., Schwartz, W.L. (1987) "*Haemophilus pleuropneumoniae* in swine." *Compend. Cont. De.* 9: F7-F13.
39. Little, T.W.A., Harding, J.D.J. (1980) "The interaction of *Haemophilus parahemolyticus* and *Pasteurella multocida* in the respiratory tract of pig." *Brit. Vet. J.* 136: 371-383.
40. Lombin, L.H., Rosendal, S.A., Mitachel, W.R. (1982) "Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia in swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*." *Canad. J. Comp. Med.* 46: 109-114.
41. Lugo, R.C., Torres, A.O., Marquez, N.L., Mendoza, E.S., Lara, S.V., Ciprián, C.A. (1990) "Estudio serológico con PLEUROTTEST* relacionado con la patología y bacteriología de pulmones colectados en rastro." V Foro Interno de Investigación. F.E.S.-C. UNAM. p. 63.
42. Mac Fading, F.J. (1980) "Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica." *De Panamericana*, Buenos Aires, Argentina
43. Maqueda, A.J. (1977) "Incidencia de neumonía enzoótica en varios estados porcicultores de cerdos de la República Mexicana" México, AMVEC, UNAM.
44. Manzat, R.M., Tataru, D., Catana, D. (1987) "Serological identification of types of *Haemophilus pleuropneumoniae* isolated from pigs" *Prod. Anim. Zoot. Med. Vet.* 37: 38-42.
45. Mendoza, E.S., Ayala, G., Torres, A.O., Ciprián, C.A. (1992) "Study of a farm affected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* using the serological test "PLEUROTTEST MR" *Proceeding 12th Int. Pig. Vet. Soc. The Hague, the Netherlands.* p:188.
46. Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. (1982) "Evaluation of slide agglutination and ring precipitation test for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*" *J. Clin. Microbiol.* 15: 1019-1023.

47. Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. (1983) "Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test" J. Clin Microbiol 18 1351-1354.
48. Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S., Leblnack, A. (1984) "A 2 mercaptoethanol tube agglutination test for the diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs." Am J Vet. Res 45: 715-719.
49. Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. (1987) "An evaluation of agglutination and co-agglutination techniques for serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates." Am. J. Vet. Res. 48: 219
50. Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S., Nadeau, M. (1992) "Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec" Vet. Microbiol 32: 135-148.
51. Moienda, J. (1988) "*Actinobacillus pleuropneumoniae*, a causative agent of pleuropneumonia in pigs." Med Weterary 44: 592-595.
52. Molnar, E. (1990) "Survey of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection in swine by different methods." Acta Vet (Hungria) 38: 231-238
53. Morilla, G.A. (1994) "Los seroperfiles en la clinica porcina" Acontecer Porcino VII (9): 65-74.
54. Morrison, R.B. (1984) "An etiological investigation into pneumonia in slaughter weight swine" Canad. J. Comp. Med. 12: 5
55. Muller, E., Korte, G., Petzoldt, K. (1986) "Isolation and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in Northwestern Germany." Proc 9th Int. Pig Vet Soc Cong, p.261.
56. Nakai, T., Kume, K., Sawata, A. (1983) "Characterization of the hemolysin produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*." Am J. Vet. Res. 44: 344-347.
57. Nakai, T., Sawata, A., Kume, K. (1985) "Duration of the complement-fixation antibodies in pigs and guinea pigs by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccine" Jpn J. Vet. Sci. 47: 503-506
58. Nakai, T., Ono, E., Ike, K., Kume, K. (1992) "Serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by use of purified capsular polysaccharide of lipopolysaccharide." Proceeding 12th Int. Pig. Vet. Soc. The Hague, the Netherlands. p.186.

59. Negrete-Abascal, E., Tenorio, V., Garcia, C., Godines, D., Serrano, J.J., Alvarez de la Cuadra, J., De la Graza, M. (1994) "*Actinobacillus pleuropneumoniae*: Virulence and Gene Cloning" Archives of Medical Research 25 (2) 229-233.
60. Nicolet, J. (1971) "Sur l'hémophiluse du porc III Diferenciation serologique *H. parahemolyticus*." Zentralbl. Bakteriell. Abt. 1 Orig B. 216: 487-495.
61. Nicolet, J., School, E. (1981) "*Haemophilus* infections. Diseases of swine", 5th. De. (A.D. Leman et al eds). Iowa State Univrsity Press, Ames p 368-377.
62. Nicolet, J., Krawinkler, M., Baumgartner, A (1981) "An enzyme linked immunosorbent assay, using an EDTA-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae* " Am. J. Vet. Res. 42: 3129-3132
63. Nicolet, J (1986) "*Haemophilus* infections Diseases of swine " 6th De. (A.D Leman et al eds) Iowa State University Pres, Ames p 426-436.
64. Nicolet, J. (1988) "Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Can Vet. J 29: 578-580.
65. Nielsen, R (1974) "Serological and immunological studies of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus parahemolyticus* " Acta Vet. Scand 15: 80-89.
66. Nielsen, R., O' Connor, P.J. (1984) "Serological characterization of 8 *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8 " Acta Vet. Scand 25: 96-106.
67. Nielsen, R. (1986) "Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal a new serotype: 12 " Acta Vet. Scand 27: 453.
68. Nielsen, R (1987) "Serological Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12." Acta Vet. Scand. 27: 453-455.
69. Olander H.J. (1963) "A septicemic disease of swine and its causative agent: *H. parahemolyticus* " Ph D. thesis, University of California, Davis.
70. Olivares, P., Morgado, A (1988) "Isolation ad serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in three porcine pleuropneumonia outbreak in central Chile." Arch. Med. Vet. (Chile). 20: 147-152.
71. Piffer, I.A., Carter, G.R., Botovchenco, A.A.F. (1986) "Identification of serotypes of *Haemophilus pleuropneumoniae* by counter immunoelectroforesis." Vct. Rec. 118: 292-294.

72. Piffer, I.A., Brito, M.A.V.P., Brito, J.R.F., Barcellos, D.E.S.N. (1987) "Serotypes of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* isolated from pigs in Brazil." *Pesquisa Vet Brasileira* 7: 79-83.
73. Pijoan, C., Ochoa, G., Méndez, D., Lastra, A. (1978) "Aislamiento de *Haemophilus paraahaemolyticus* de cerdos con neumonia." *Tec. Pec. en Méx* 34: 85-87.
74. Pijoan, C (1982) "*Haemophilus pleuropneumoniae*." *Mod Vet Prac* 63: 653-645.
75. Pijoan, C (1983) "Dilution techniques for isolation of *Haemophilus* from swine lungs collected at slaughter." *J. Clin Microbiol.* 18: 143-145.
76. Pijoan, C., Morrison, R.B. (1983) "*Haemophilus pleuropneumoniae*" *Proc. Ann. Conf. Swine Herds Health Programing.* : 199-206.
77. Pijoan C (1984) "*Haemophilus updata*." *Proc. Ann. Conf. Swine Herd Health Programming.* p 111a .
78. Pijoan, C (1985) "Serology and immunology of *Haemophilus pleuropneumoniae*." *Haemophilus pleuropneumoniae Compendium AASP Ann Mtg March.* p: 23-27.
79. Pohl, S, Bertschinger, H.U., Fredericken, W., Mannhein, W. (1983) "Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella haemolytica*-organism 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.
80. Power, S.B., Quigley, F.C., Pritchard, D.G., Croston, P. (1983) "Porcine pleuropneumonia associated with *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 3 in the Republic of Ireland." *Vet. Rec.* 113: 113-114.
81. Rapp, V.J., Ross, R.F., Erickson, B.Z. (1985) Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody test in swine." *Am. J. Vet. Res.* 46: 185-192.
82. Rosendal, S., Lombin, L., De Moor, J. (1981) "Serotyping and detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* by indirect fluorescent antibody technique." *Can. J. Comp. Med.* 45: 271-274
83. Rosendal, S., MacInnes, J.T. (1981) "Vaccination against pleuropneumonia of pigs caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*." *Canad. Vet J.* 22: 34-35.
84. Rosendal, S., Boyd, D.A. (1982) "*H. pleuropneumoniae* serotyping." *J. Clin Microbiol.* 16 (5): 840-843.

85. Rosendal, S., Mitchel, W.R. (1983) "Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: A survey of Ontario pork production." *Canad. J. Comp. Med.* 47: 1-5.
86. Rosendal, S., Mittal, K.R. (1985) "Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria." *Canad. J. Comp. Med.* 49: 68-74.
87. Sanford, S.E., Josephson, G.K.A. (1981) "Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae* epizootic in southwestern Ontario: clinical, microbiological pathological and some epidemic findings." *Canad. J. Comp. Med.* 45: 2-7.
88. Schimmel, D., Hass, R. (1983) "Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains." *Arch. Exp. Vet. Med.* 37: 542-551.
89. Schultz, R.A. (1982) "Prevalence of antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* in Iowa swine." *A.J.V.R.* 43: 1848-1851.
90. Schultz, R.A., Ross, R.F., Gunarsson, A., Nielsen, R. (1983) "Serotyping 50 different isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* from swine pleuropneumonia on Iowa and surrounding states." *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 78: 1451-1453.
91. Sebunya, T.N.K., Saunders, J.R. (1982) "*Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: A review." *J. A.V.M.A.* 182: 1331-1337.
92. Sebunya, K., Saunders, J.R., Osborne, A.D. (1983) "A model aerosol exposure system for induction of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*." *Canad. J. Comp. Med.* 47: 48-53.
93. Shope, R.E. (1964) "Porcine contagious pleuropneumonia I y II. Experiment transmission, etiology and pathology." *J. Exp. Med.* 19: 357- 368.
94. Sidoli, L., Barigazzi, G., Schianchi, P. (1987) "La pleuropneumonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Italia." *Selez. Vet.* 28: 21-37.
95. Skolova, Z., Gois, M. (1987) "Identification of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* strains by coagglutination test." *Vet. Med. (Czech)* 32: 469-477.
96. Straw, B. (1983) "Effect of animal factors, management and diseases on productivity of finishing pigs." Thesis PhD. University of Minnesota.
97. Straw, B., Shin, S., Calliton, D., Peterson, M. (1985) "Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine." *Canad. J. Comp. Med.* 49: 149-151.

98. Tarasiuk, K., Pejsak, Z., Palka, E., Blaszczyk, B. (1991) "Acute form of pleuropneumonia in pigs caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9" *Med. Wetery* 47: 348-350.
99. Vena, M.M., Miquet, J.M., Nardone, P. (1988) "Detection and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs in Argentina by coagglutination test." *Proc. 10th Int. Pig. Vet. Soc. Congr. Rio de Janeiro, Brazil.* p 80.
100. Wilson, P.J., Osborne, A.D. (1984) "Solid-phase Enzyme-linked immunoassay to detect type specific swine antibodies against *Haemophilus pleuropneumoniae*." *Canad. Vet. J.* 25: 111.
101. Yeh, T.G. (1990) "Serotyping and detection of *H. pleuropneumoniae* by coagglutination in Korea." *Proc. 11th Int. Pig. Vet. Soc. Congr. Lausanne, Switzerland,* p33. 38d