

## CORRELACION ENTRE LA SEROTIPIFICACION DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* Y SU AISLAMIENTO EN CERDOS DE RASTRO a

Lourdes Ontiveros Corpus b

José Camacho Machin c

Jaime Alvarez de la Cuadra J. d

### RESUMEN

Se colectaron 145 muestras de pulmón y sangre de cerdos de abasto. Del tejido pulmonar se realizó el aislamiento de *A. pleuropneumoniae*. Las cepas aisladas se tipificaron por medio de la técnica de aglutinación en placa con sueros monoespecíficos. A los sueros de los mismos animales se les practicaron pruebas de aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol y fijación de complemento. Se lograron identificar 31 animales positivos serológicamente de los cuales 25, resultaron positivos al aislamiento, representando el 81% de animales seropositivos en los que se confirmó la infección. De los 25 aislamientos de *A. pleuropneumoniae* se identificaron 10 como serotipo 1 (40%), 3 del serotipo 4 (12%), 8 del serotipo 5 (32%), 3 del serotipo 7 (12%) y 1 del serotipo 8 (4%). Los 31 sueros positivos a *A. pleuropneumoniae* reaccionaron a los mismos serotipos aislados. A estos resultados se les realizó la prueba de  $\chi^2$  (ji cuadrada) encontrándose una alta correlación entre el aislamiento y la serología.

PALABRAS CLAVE: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Aislamiento, Serotipificación.

Tec. Pec. Mex. Vol. 33 No.1, (1995)

### INTRODUCCION.

La alta incidencia de lesiones pulmonares en los cerdos causa daños considerables en la economía, por lo que, el estudio de las neumonías porcinas y la investigación de su etiología es primordial, para lograr su prevención y control (1,2).

Comúnmente, un crecimiento de *A. pleuropneumoniae* es fácilmente obtenido de pulmones de animales con infección neumónica de tipo agudo, mientras que en casos crónicos, el aislamiento a partir de tejidos y órganos como los pulmones y la pleura es variable (3, 4, 2, 5). En lesiones crónicas, es difícil el aislamiento y las pruebas serológicas son el método más adecuado para obtener el diagnóstico (6, 7).

Durante el curso de la infección los anticuerpos aparecen en sangre, donde pueden ser detectados con pruebas

serológicas; estas permiten tener un panorama más real de lo que está ocurriendo en la piara que padece la enfermedad; también se detectarían los animales infectados crónica y subclínicamente. En piaras de engorda infectados subclínicamente con *A. pleuropneumoniae*, es común que los signos no se presenten y que los cerdos de estas piaras sean comúnmente portadores que pueden causar epidemias agudas al ser trasladados a otras unidades o granjas (6, 8); por lo tanto, es importante que estos serorreacores sean detectados lo más pronto posible.

Todos los cerdos expuestos pueden ser afectados, con mortalidad de casi el 80%. Los signos clínicos de la pleuronemonía aguda pueden presentarse dentro de las 24 horas después de la infección. En el estudio posmortem se observan áreas de neumonía fibrino-hemorrágica y pleuresía serofibrinosa en todos los lóbulos del pulmón, más comúnmente en el lóbulo caudal (1, 9, 10). Pijoan y colaboradores (11) aislaron e identificaron el microorganismo por vez primera en México, de brotes de pleuropneumonía contagiosa porcina (PCP),

a Recibido para su publicación el 13 de julio de 1994.

b CENID-Microbiología, INIFAP-SAGDR. Carretera México Toluca Km. 15.5 Col. Palo Alto D.F. C.P. 05110.

c BEKMAN INSTRUMENTS DE MEXICO, S.A. DE C.V. Chilpancingo No. 148, Col. Roma Sur A.P. 27-124, C.P. 06760 México, D.F.

d CIATEJ-Av. Normalistas No. 800 Guadalajara, Jal.

en los estados de Tlaxcala y Michoacán. A partir de entonces, la PCP ha sido descrita en la mayoría de las cuencas porcícolas del país; sin embargo, se han realizado pocos estudios encaminados a la tipificación de las cepas aisladas de *A. pleuropneumoniae*. El objetivo del presente estudio fue el de correlacionar la serología, aislamiento y serotipificación de *A. pleuropneumoniae* en cerdos de abasto.

## MATERIALES Y METODOS

### Preparación de antígenos.

Para la obtención de los antígenos se utilizaron las cepas de *A. pleuropneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 que fueron proporcionados por el Dr. Richard Ross de la Universidad Estatal de Iowa (Iowa State University). Cada uno de los serotipos de *A. pleuropneumoniae* se desarrollaron en medio de BHI mas 5% de extracto de levadura fresca y se incubaron a 37°C durante 8 hrs, después de este tiempo se inactivó con formaldehído 0.3% V/V durante 18 hrs a temperatura ambiente. Se separó el paquete celular a 3000 g durante 20 min a 4°C y se lavó con solución salina fisiológica, finalmente se resuspendió en amortiguador de fosatos pH 7.4 a una densidad óptica (DO) = 0.4 a 550 nm (12).

### Preparación de sueros hiperinmunes.

Se llevó a cabo en conejos Nueva Zelanda, de aproximadamente 2 kg de peso, los cuales fueron inoculados por vía intravenosa con una suspensión bacteriana inactivada a una concentración de  $1200 \times 10^6$  M.O./ml., dos veces por semana durante dos semanas con las dosis siguientes: 0.5, 1, 2 y 3 ml, seguidos de dos inoculaciones de 3 ml de una suspensión bacteriana de células vivas, estandarizada a una DO=1 con intervalo de una semana. Al término de las inoculaciones, los conejos fueron sangrados, separándose los sueros que fueron almacenados a -20°C hasta el momento de ser utilizados (12, 13).

### Colección de Muestras.

Se tomaron 145 muestras al azar de pulmón y sangre de cerdos del rastro de San Lorenzo Riotenco en el municipio de Cuautitlán México, febrero-octubre 1990. Para que las muestras fueran al azar se seguía a un cerdo de cada 10 que entraban en la línea de sacrificio, tomándose la muestra de sangre al momento del desangrado, siguiéndose al mismo animal por medio de una marca en la oreja para la selección de muestra de pulmón al momento de la evisceración, en la forma más aséptica posible. La muestra de pulmón fue tomada no delimitando las zonas afectadas.

Las muestras de sangre se centrifugaron para la separación de suero y estas se guardaron en frascos estériles a -20°C hasta el momento de ser utilizadas. Los estudios bacteriológicos y serológicos se realizaron en el Laboratorio de Bacteriología del CENID-Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Los animales muestreados provenían de los Estados de Jalisco y Michoacán.

### Estudio bacteriológico.

Las muestras de pulmón se trasladaron al laboratorio en frascos estériles. Se observaron macroscópicamente para determinar las partes en apariencia afectadas y proceder al aislamiento y estudio bacteriológico. Se tomó la porción de pulmón, tratando de seleccionar las zonas que presentaron focos neumónicos. La superficie de la porción seleccionada se cauterizó con una espátula al rojo vivo, y se separó el tejido; se procesó siguiendo la técnica de dilución (14, 15), se tomó una muestra de 1 cm<sup>3</sup> y se colocó en un tubo que contenía BHI con 5% de extracto fresco de levadura, este tubo se marcó la dilución  $10^{-1}$  agitándose vigorosamente, se continuaron haciendo diluciones hasta  $10^{-5}$ . Estas diluciones se incubaron por toda la noche a 37°C y la mayor dilución que mostró turbidez fué sembrada en placa de agar sangre con cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* e

incubadas toda la noche. Las colonias que mostraron satelitismo a *S. aureus* fueron seleccionadas para ser caracterizadas posteriormente.

#### **Identificación de cepas.**

A todas las cepas seleccionadas, se les practicaron las pruebas bioquímicas descritas por Biberstein y colaboradores (16), las cuales inducen fermentación de carbohidratos, producción de ureasa y producción de porfirinas. Otra prueba para la identificación fue la de CAMP, utilizando placas de agar sangre y la cepa nodriza de *S. aureus*, tomándose como positiva cuando se presentaba una hemólisis completa en la zona donde se desarrollaban ambas cepas. Una vez identificados los aislamientos como *A. pleuropneumoniae*, fueron serotipificados por medio de la prueba de aglutinación en placa, utilizando los sueros hiperinmune mono-específicos.

#### **Estudios serológicos.**

1). Relación antigénica entre las diferentes cepas de *A. pleuropneumoniae*.

Para determinar la presencia de posibles reacciones cruzadas entre los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae*, se realizaron pruebas de aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol y fijación de complemento, utilizando los antígenos obtenidos para cada uno de los serotipos, contra los sueros hiperinmunes de conejos, de cada uno de los diferentes serotipos (17).

2). Prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol.

Se realizaron diluciones dobles de los sueros mono-específicos así como de los obtenidos en rastro con solución salina fisiológica, que contenía 2-mercaptoetanol a una concentración de 0.1 M en volúmenes iguales (1 ml), iniciando con una dilución 1:4 hasta una dilución final 1:1024; éstas fueron mezcladas con el antígeno en los tubos, incubándose a 37 C por 18 hrs; después de este tiempo, se procedió a tomar la

lectura. El título de anticuerpos se tomó como la dilución más alta a la cual dió una aglutinación francamente visible (5). Se siguió el mismo procedimiento utilizando cada uno de los antígenos *A. pleuropneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

3). Prueba de Fijación de complemento.

Se llevó a cabo en placas de microtitulación, utilizando 25 µl de complemento de cuye con 5 unidades hemolíticas; 25 µl del antígeno de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 a una dilución equivalente al tubo No 1 del Nefelómetro de MacFarland (300 x 10<sup>6</sup> M.O/ml) y 25 µl de los sueros problema, previamente inactivados a 56 C por 30 min en baño maría. Las placas fueron incubadas a 4 C durante toda la noche, administrándose después 25 µl de glóbulos rojos de carnero sensibilizados. Los glóbulos rojos de carnero se colectaron en solución de Alsever al 2% y lavados, con diluyente de veronal amortiguado y sensibilizados con hemólisisina. Las placas fueron incubadas a 37 C por 30 min y centrifugados a 1500 g por 5 min, la reacción fue leída visualmente en un espejo lector de microplacas, tomándose como positivos los pozos donde se presentaba 100% de hemólisis.

Todas las pruebas se llevaron a cabo nuevamente en las mismas condiciones, variando solamente el antígeno, éste fue calentado a 56 C durante 10 min antes de ser utilizados para cada una de las pruebas. (13, 18).

#### **RESULTADOS.**

Los antígenos de *A. pleuropneumoniae* serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se ajustaron a una DO=0.4 a 550 nm, se probaron con los sueros mono-específicos, por medio de la prueba de aglutinación en tubo, dando un título de anticuerpos de hasta 1:256, sin

encontrar reacciones inespecíficas.

Al realizar la prueba con los mismos sueros pero con los antígenos calentados a 56 C por 10 min en baño maría, se observó un aumento en el título de anticuerpos de hasta 2 a 3 diluciones en todos los serotipos, lo que demuestra que otros determinantes antigénicos fueron reconocidos después de éste tratamiento (Cuadro 1).

**Estudio Bacteriológico.**

Se tomaron 145 muestras de pulmón de cerdo, las cuales se identificaron previamente para efectuarles el estudio bacteriológico correspondiente. Se logró aislar *A. pleuropneumoniae* en sólo 25 muestras, mismas que procedían de diferentes estados de la República, correspondiendo 17 a pulmones de animales provenientes del estado de Michoacán y 8 del estado de Jalisco. Las cepas aisladas fueron serotipificadas con los sueros mono-específicos, a través de la prueba de aglutinación rápida en placa.

De las 25 muestras positivas al aislamiento de *A. pleuropneumoniae*, se obtuvieron diferentes porcentajes para los serotipos probados, encontrándose 10 como serotipo 1 (6.8%), 3 del serotipo 4 (2%), 8 del serotipo 5 (5.5%), 3 del serotipo 7 (2%) y 1 del serotipo 8 (0.7%). Cabe mencionar que el aislamiento de *A. pleuropneumoniae* en algunos casos fué de forma pura, y en otras con crecimiento de diferentes bacterias como *P. multocida*.

**Estudio Serológico.**

**Pruebas de aglutinación.**

A las 145 muestras de sueros, se les practicaron las pruebas de aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol y fijación de complemento, obteniéndose 31 sueros positivos para ambas pruebas, lo que representa un 21.3% del total de los sueros. De éstos, 11 presentaron reacción específica con el antígeno del serotipo 1 (35.4%), 2 con antígeno del serotipo 3 (6.4%), 3 con el antígeno del serotipo 4 (9.7%), 9 con el

**CUADRO 1**  
COMPARACION DE ANTIGENOS DE *A. pleuropneumoniae* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8  
UTILIZANDO LA PRUEBA DE AGLUTINACION EN TUBO

SEROTIPO	Ag	SUERO DE CONEJO HIPERINMUNES								
		1	2	3	4	5	6	7	8	C
1	AC	64	-	-	-	-	-	-	-	-
	DC	128	-	-	-	-	-	-	-	-
2	AC	-	256	-	-	-	-	-	-	-
	DC	-	256	-	-	-	-	-	-	-
3	AC	-	-	256	-	-	-	-	-	-
	DC	-	-	256	-	-	-	-	-	-
4	AC	-	-	-	128	-	-	-	-	-
	DC	-	-	-	256	-	-	-	-	-
5	AC	-	-	-	-	32	-	-	-	-
	DC	-	-	-	-	256	-	-	-	-
6	AC	-	-	-	-	-	32	-	-	-
	DC	-	-	-	-	-	64	-	-	-
7	AC	-	-	-	-	-	-	4	-	-
	DC	-	-	-	-	-	-	32	-	-
8	AC	-	-	-	-	-	-	-	16	-
	DC	-	-	-	-	-	-	-	256	-

Ag = Antígeno de células completas.  
AC = Ag Antes de calentar a 56 c por 10 min.  
DC = Ag Después de calentar a 56 C por 10 min.

Los resultados se expresan como un recíproco del título de aglutinación.  
(Mittal *et al*, 1986 (21))

antígeno del serotipo 5 (29%), 4 con el antígeno del serotipo 7 (12.9%) y 2 con el antígeno del serotipo 8 (6.5%).

**Pruebas cruzadas.**

**Prueba de 2-Mercaptoetanol.**

Al probarse los diferentes antígenos de *A. pleuropneumoniae* todos reaccionaron con su serotipo homólogo, advirtiéndose que los antígenos manifestaron reacciones cruzadas. En el caso del serotipo 2, este reaccionó frente al serotipo 5, y el serotipo 3 manifestó una reacción múltiple con los serotipos 2, 6 y 8, el antígeno 5 respondió con el serotipo 2, el 6 presentó una reacción cruzada con los serotipos 3 y 8; finalmente, para el antígeno del serotipo 8 este reaccionó frente a los serotipos 2, 3 y 6 (Cuadro 2).

**Prueba de fijación de complemento.**

Los resultados fueron los mismos que para la prueba anterior, observándose que la presencia de reacciones cruzadas fueron menores, el antígeno del serotipo 3 reaccionó con el serotipo 8, y el antígeno del serotipo

8 reaccionó con los sueros de los serotipos 3 y 6 (Cuadro 2).

Los resultados obtenidos muestran a través de la prueba de  $X^2$  (ji cuadrada) una alta correlación ( $p < 0.01$ ), entre los aislamientos obtenidos y los sueros positivos a las pruebas serológicas utilizadas en este estudio.

**DISCUSION.**

Los antígenos elaborados en este trabajo presentaban problemas de aglutinación pobre; ésto se eliminó tratando el antígeno a 56 C por 10 minutos, pues existen informes que demuestran que el calentamiento del antígeno parece remover antígenos capsulares de la superficie (21, 7) y expone en mayor grado los aglutinógenos que estan bajo la superficie; esto se logró reafirmar cuando se calentaron los antígenos en estudio, y se observaron mejores resultados en la titulación de los sueros, de hasta dos o tres diluciones más en las pruebas

**CUADRO 2**  
 RESULTADOS DE LAS REACCIONES CRUZADAS ENCONTRADAS EN LOS SUEROS DE CERDOS CON LOS ANTIGENOS DE *A. pleuropneumoniae* SEROTIPOS 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8

SUEROS POSITIVOS A SEROTIPOS	PRUEBA USADA	NUMERO DE SUEROS POSITIVOS TAMBIEN A SEROTIPOS									
		1	2	3	4	5	6	7	8	C	
1 (11)	2-ME FC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ( 0)	2-ME FC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 ( 2)	2-ME FC	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
4 ( 3)	2-ME FC	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
5 ( 9)	2-ME FC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 (0)	2-ME FC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 (4)	2-ME FC	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
8 (2)	2-ME FC	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-

2-ME = Aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol, sueros positivos al serotipo 1 con título 1:16, todos los demás serotipos 1:8

(Mittal *et al* 1984) (12).

FC = Fijación de complemento, sueros positivos con título 1:4

(Goyette *et al* 1986 (19), Hoffman 1989(20).

aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol y fijación de complemento; resultados muy semejantes a los obtenidos por Gunnarsson y colaboradores (22), quienes al calentar su antígeno para la prueba de inmunodifusión, encontraron que los títulos aumentaban y algunos negativos resultaban ser positivos. El aislamiento y la caracterización de *A. pleuropneumoniae* es necesaria para excluir la presencia de cualquier otro agente como probable causante de neumonía; además de poder determinar los serotipos prevalentes en la zona de estudio.

Ciprián y colaboradores (23) durante ocho meses (febrero a septiembre), observaron 41,060 pulmones de cerdos de abasto, encontrando que todas las cepas de *A. pleuropneumoniae* que aislaron, fueron identificadas como serotipo 1.

En este trabajo el principal serotipo aislado fue el 1; sin embargo, también se logró el aislamiento de los serotipos 4, 5, 7, 8. Díaz y colaboradores (3) ya habían informado la presencia de estos serotipos en 9 estados de la República; cabe mencionar que los pulmones de donde se obtuvieron los aislamientos provenían de cerdos con pleuroneumonía, por lo que se obtuvo un alto porcentaje de aislamientos (88%). Los serotipos encontrados en mayor porcentaje fueron el 1 y 5, informándose por primera vez el serotipo 8; sin embargo, éste fue a partir de pulmones de cerdos con pleuroneumonía provenientes de granjas con problemas neumónicos.

El hecho de que en cerdos de abasto se haya logrado el aislamiento de éstos serotipos, nos sugiere que el movimiento de animales de importación ha traído como consecuencia la introducción de nuevos serotipos que no se habían informado.

En las pruebas serológicas se encontró que el mayor número de sueros positivos fueron contra los serotipos 1 y 5, siendo éstos los principales causantes de la infección en Estados Unidos de Norteamérica y Canadá (7, 24). Relacionando éstos resultados con

los aislamientos se encontró que los que tienen mayor proporción son éstos mismos serotipos. Por otro lado se ha informado, que en infecciones naturales existe reacción cruzada, encontrándose también esto en este trabajo, entre los serotipos 1, 3, 5, 8. (21). En este trabajo se confirmó la presencia del serotipo 8; sin embargo, no se logró aislar el serotipo 6. El mayor número de aislamientos se encontró en los pulmones de los animales que provenían de los estados de Michoacán, y se encontraron en mayor proporción el serotipo 1 y 5, esto concuerda con los resultados obtenidos por Díaz y colaboradores (3). Otra posibilidad es que se trate de reacciones cruzadas ya que se ha encontrado que los antígenos del serotipo 1 son parecidos a los antígenos del serotipo 5 (19, 24).

Todos los animales sacrificados en este rastro son procedentes de los estados de Michoacán y Jalisco, lo que sugiere la presencia de varios serotipos en el área de mayor producción porcícola en México (3, 23).

#### **CORRELATION BETWEEN THE SEROTYPING OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* AND ITS ISOLATION FROM SLAUGHTER PIGS.**

#### **SUMMARY**

One hundred and forty five lung and blood samples were collected from slaughter pigs. Isolation of *A. pleuropneumoniae* from lung tissue was attempted and the isolates were typed by agglutination test with monospecific sera. Serum samples from the same animals were analyzed by 2-ME agglutination and complement fixation tests. Antibodies were detected in 31 sera and it was possible to isolate *A. pleuropneumoniae* in lung tissue samples from 25 of these animals. In this way, infection was confirmed in 81% of the seropositive animals. From the 25 isolates 10 were identified as serotype 1 (40%), 3 as serotype 4 (12%), 8 as serotype 5 (32%), 3 as serotype 7 (12%) and 1 serotype 8 (4%). The 31 positive serum samples reacted with these strains. Analysis of the results by  $\chi^2$  test indicated high correlation between serology and isolation of *A. pleuropneumoniae*.

**KEY WORDS.** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Serotyping, Isolation.

## REFERENCIAS

1. Straw E B. Performance measure in pigs with pneumonia and housed in different environments. JAVMA 1991; (4) 627.
2. Hoffman L J, Carballo J P, Henderson L M. Clinical, bacteriologic and serologic features of *Haemophilus pleuropneumoniae* outbreaks in Iowa swine. 28th Ann Porc of Amer Assn of Vet. Lab Diagn 1987; 211.
3. Díaz C, González M, Jiménez E, Stephano A. Identificación de diferentes serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* aislados de México de cerdos con pleuropneumonia de 1985-1988, Veterinaria México 1989; XX: 157.
4. García J C. Citotoxicidad de sobrenadantes de diferentes serotipos de *Haemophilus pleuropneumoniae* sobre macrófagos alveolares. Tesis de Maestría, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 1988.
5. Mittal K R, Higgins R, Lorivière S, Madeau M. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain isolated from pigs in Quebec. Veterinary Microbiology 1992; (32) 135.
6. Fenwick B W. 1990. Diagnóstico de Pleuropneumonia Porcina en Laboratorio. Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* Ed. AMVEC GUADALAJARA JAL: 17.
7. Gunnarsson A, Hurvell B, Biberstein E L. Serologic studies of porcine strain of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: Antigenic specificity and relationship between serotypes. Am. J. Vet. Res. 1978; 39 (8) 1286.
8. Rodnwy K, Frank M M, Chengappa R D, Oberst, K J, Hennessy S C, Henry B, Fenwick. Pleuropneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 2 in growing and finishing pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 1992; (4) 270.
9. Bertram T A. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae* Vet. Pathol. 1985; (22) 598.
10. Sarders R J, Osborne D A, Sebunya K T. Pneumonia in Saskatchewan swine: abattoir incidence of intrathoracic lesions in pigs from a herd infected with *Haemophilus pleuropneumoniae* and from other herds Can. Vet. J. 1981; (22) 244.
11. Pijoan C, Ochoa G, Méndez D, Lastra A. Aislamiento de *Haemophilus parahaemolyticus* de cerdos con neumonía. Tec. Pecu. Méx. 1978; (34) 85.
12. Mittal K R, Higgins R, Lorivière S A, 2- mercaptoetanol tube agglutination tests for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Am. J. Vet. Res 1984; 45 (5) 715.
13. Rapp J V, Ross F R, Young T. Characterization of *Haemophilus spp* isolated from healthy swine and evaluation of cross-Reactivity of complement fixing antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus taxon "Minor Group"*. J. Clin. Microbiol. 1985; (22) 945.
14. Pijoan C, Morrison B R, Hilly D H. Dilution technique for isolation of *Haemophilus* from swine lungs collected and slaughter. J. Clin. Microbiol. 1983; 18 (1) 143.
15. Rennie R, Gordon T, Yaschu K Y, Tomlin P, Kibsey P, Albritton W. Laboratory and Clinical Evaluation of Media for the Primary Isolation of *Haemophilus* Species. 1992; 30 (8) 1917.
16. Biberstein E L, Gunnarson A, Hurvell B. Cultural and biochemical criteria for the identification of *Haemophilus spp*, Vet. Pathol. 1977; (23) 681.
17. Rosendal S, Boyd A. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. J. Clin. Microbiol. 1982; (16) 840.
18. Shultz R A, Young T F, Roiss R F, Jeske D R. Prevalence of antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* in Iowa Swine. Am. J. Vet. Res. 1982; (15) 640.
19. Goyette G, Larivière, Mittal K R, Higgins R, Martineau G P. Comparison of CFT and tube agglutination test with 2ME in pigs from the herds with out *Haemophilus pleuropneumoniae* infection". Proc. Int. Pig Vet. Cop. Congr. Spain 1986.
20. Hoffman L J. *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*: Use of coagglutination and complement fixation to determine the relationship between presence of organisms and antibody titer in slaughterhouse pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 1989; (1) 12.
21. Mittal K R, Higgins R, Lorivière S. Studies and cross reaction among *Haemophilus pleuropneumoniae* strains belonging to serotypes 3, 5, 6 and 8. I.P.V.S. Barcelona España 1986.
22. Gunnarson A. Serologic studies on porcine strain of *Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae)*: Extraction of type-specific antigens. Am. J. Vet. Res. 1979; 40 (4) 469.
23. Ciprián C A, Medina A G, Fuentes R M, Pijoan A C, Torres A O, Colmenares A G, Camacho M J. Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos de México. Veterinaria México 1988; XIX (3) 305.
24. Gunnarsson A, Biberstein L, Hurvell B. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus pleuropneumoniae*: Agglutination reaction. Am. J. Vet. Res. August 1977, 1111.