

- ciones porcinas de Castilla y León, frente a la infección natural por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Actas del XII Congreso de la S.E.M.* Pamplona: 107.
- 4) KUME, K.; NAKAI, T. & SAWATA, A. (1984). Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the nasal cavities of healthy pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 46(5): 641-647.
 - 5) LERESCHE, E. (1988). Field trials of a combined vaccination against *Haemophilus pleuropneumoniae* and pasteurellosis in pigs exposed to a natural challenge to respiratory disease in a fattening unit (by mixing of young pigs coming from a SPF unit respectively from a unit with EP problems.). *Proc. 10th IPVS Congr.*, Río de Janeiro, Brazil: 88.
 - 6) LOMBIN, L.H.; ROSENDAL, S. & MITCHELL, W.R. (1982). Evaluation of the complement fixation test for the diagnosis of pleuropneumonia of swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.*, 46: 109-114.
 - 7) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R.; LARIVIERRE, S. & LEBLANC, D. (1984). A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 45(4): 715-719.
 - 8) MYLREA, P.J.; FRASER, G.; MACQUEEN, P. & LAMBOURNE, D.A. (1974). Pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus parahaemolyticus*. *Aust. Vet. J.*, 50: 255-259.
 - 9) NIELSEN, R. (1982). *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. Doctoral Thesis, Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen.
 - 10) RAPP, V.J.; ROSS, R.F. & ZIMMERMANN ERICKSON, B. (1985). Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 46(1): 185-192.
 - 11) RODRIGUEZ FERRI, E.F.; GUTIERREZ MARTIN, C.B.; ARGUELLO, J.L. & de la FUENTE, R. (1988). Aislamiento y serotipificación de *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* y *H. parasuis* de neumonías y pleuroneumonías porcinas en Castilla y León. *Actas de la III Reunión del Grupo de Taxonomía Bacteriana de la S.E.M.*; Madrid, P-30.
 - 12) RODRIGUEZ FERRI, E.F.; GUTIERREZ MARTIN, C.B.; VAZQUEZ BOLAND, J.A. & ARGUELLO VILLARES, J.L. (1989). Nuevas aportaciones acerca de la presencia de *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* en Castilla y León. *Actas del XII Congreso Nacional de la S.E.M.*, Pamplona: 106.
 - 13) RODRIGUEZ FERRI, E.F.; GUTIERREZ MARTIN, C.B.; VAZQUEZ BOLAND, J.A.; SUAREZ ESTRADA, J.; de la FUENTE LOPEZ, R. & GARCIA PEÑA, F.J. (1989). Distribución estacional y geográfica de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* aisladas en España. Estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Med. Vet.*, 6(12): 707-712.
 - 14) SCHULTZ, R.A.; YOUNG, T.F.; ROSS, R.F. & JESKE, D.R. (1982). Prevalence of antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* in Iowa swine. *Am. J. Vet. Res.*, 43(10): 1.848-1.851.
 - 15) SEBUNYA, T.N.K. & SAUNDERS, J.R. (1983). *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *J.A.V.M.A.*, 182 (12): 1.331-1.337.
 - 16) SHOPE, R.E. (1964). Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. Exp. Med.*, 119: 357-368.
 - 17) SIDOLI, L.; BARIGAZZI, G. & SCHIANCHI, P. (1987). La pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Italia. *Sel. Vet.*, 28(4): 21-37.

ESTUDIO DE LA PLEURONEUMONIA PORCINA EN LA PROVINCIA DE LEÓN. II. COMPARACION DE LAS TECNICAS FIJACION DEL COMPLEMENTO, ELISA Y AGLUTINACION CON 2-MERCAPTOETANOL

(PORCINE PLEUROPNEUMONIA IN LEON (SPAIN). II. COMPARISON OF COMPLEMENT FIXATION, ELISA, AND 2-MERCAPTOETHANOL AGGLUTINATION TECHNIQUES)

Por C.B. Gutiérrez Martín, *
R.I. Tascón Cabrero, *
J.A. Vázquez Boland *
y E.F. Rodríguez Ferri *

Palabras clave: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, fijación del complemento, ELISA, aglutinación con 2-mercaptoetanol.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, complement fixation, ELISA, 2-mercaptoethanol agglutination.

SUMMARY

A comparative study of complement fixation, ELISA, and 2-mercaptoethanol agglutination techniques adapted to the diagnosis of porcine pleuropneumonia, was carried out. By starting off from 339 sera it was proved that the most sensitive technique was ELISA. Complement fixation -although not as satisfactory as the previous one- produced some acceptable results. While, compared with the other two, 2-mercaptoethanol agglutination was the one which showed the worst results, as much in respect to the number of positive sera as in relation to the titers, and so we do not regard it as useful for the detection of antibodies against *A. pleuropneumoniae*.

* Unidad Docente de Microbiología e Inmunología.
Dpto. de Patología Animal. Sanidad Animal. Universidad de León.
An. Fac. Vet. León. 1989, 35, 127-136

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo entre las pruebas de fijación del complemento, ELISA y aglutinación con 2-mercaptoetanol, adaptadas al diagnóstico de la pleuroneumonía porcina, originada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Se partió de 339 sueros y se comprobó que la técnica más sensible era el ELISA. La fijación del complemento, aunque no igualó a la prueba anterior arrojó unos resultados aceptables, en tanto que la aglutinación con 2-mercaptoetanol fue, con diferencia sobre las otras dos, la que reveló los peores resultados, tanto en cuanto al número de sueros positivos como en relación con los títulos, por lo que no la consideramos útil para la detección de anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae*.

INTRODUCCION

El estudio de la pleuroneumonía porcina ha preocupado a gran número de investigadores desde que se describiera el proceso por primera vez, hace más de veinticinco años²⁸, al ocasionar pérdidas cuantiosas, fundamentalmente a causa de los retrasos considerables que produce en el crecimiento, motivados por el carácter crónico que normalmente presenta²³.

El diagnóstico de la enfermedad se ha llevado a cabo mediante la detección directa del microorganismo vivo a partir del aparato respiratorio, o bien de sus restos antigénicos en el cadáver (coaglutinación^{15, 17}, inmunofluorescencia indirecta^{2, 10}, técnicas inmunohistoquímicas^{11, 22}).

Sin embargo ha sido más utilizado un diagnóstico indirecto, consistente en la demostración de anticuerpos en los animales hospedadores. En este sentido, se han empleado numerosas pruebas serológicas, entre las que podemos citar desde técnicas tan tradicionales como la aglutinación en porta o la hemaglutinación indirecta¹⁴, hasta otras de uso muy reciente, como el inmunoblotting^{3, 20}.

La técnica que ha destacado por su utilización sobre las demás ha sido la fijación del complemento (F.C.). A pesar de lo extendido de su empleo y de contar con la confianza de muchos, presenta una serie de inconvenientes que se han tratado de subsanar recurriendo a la utilización de técnicas alternativas, algunas en pleno apogeo como el enzimoimmunoensayo (ELISA)^{12, 13, 19, 21, 26, 29} y otras más antiguas, cuyo empleo ha sido adaptado a partir de otras enfermedades, como la aglutinación con 2-mercaptoetanol (A-2ME)^{5, 6, 7, 16}. En este estudio efectuamos la comparación de las tres técnicas serológicas citadas, para conocer cuál es la que proporciona los mejores resultados de cara al diagnóstico de la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Para el estudio de las tres técnicas se utilizaron 339 sueros pertenecientes a cerdos sometidos a condiciones de cebadero.

F.C.

Esta técnica ya ha sido descrita anteriormente⁹. El antígeno consistió en una mezcla, a partes iguales, de los serotipos 2, 3, 4, 7 y 8.

ELISA

Se adaptó la metodología utilizada en Canadá por Larivière¹². El antígeno se preparó a partir de crecimientos de seis horas en agar PPLO enriquecido²⁵. Se despegó con solución salina formolada (0,5%) y se mantuvo durante una noche en condiciones de refrigeración. La suspensión celular era ajustada posteriormente a una densidad óptica de 2, a 540 nm y calentada a 100°C durante 60 minutos. Los restos bacterianos eran separados del sobrenadante mediante centrifugación a 7.500x g, quince minutos. Este último se filtraba a través de un poro de 0,22 µm de diámetro y se conservaba a 4°C. Se utilizaron los mismos serotipos que en la F.C.

Para la realización de la técnica se emplearon microplacas de 96 pocillos (Costar), a las que se incorporaban 200 µl del antígeno únicamente a los pocillos de las columnas impares, disuelto el tampón carbonato de pH 9,6, según título. Los pocillos de las columnas pares eran tapizados con el mismo volumen de tampón carbonato. La adsorción a la placa se lograba mediante incubación a 4°C durante dieciocho horas. Transcurrido este tiempo se efectuaron tres lavados sucesivos con tampón PBS-Tween 20 (al 0,005%). A continuación, se añadían 200 µl de gelatina (Difco) diluida al 3% en tampón PBS y se incubaban durante tres horas, a 37°C. Se procedía, entonces, a la realización de tres nuevos lavados para añadir seguidamente 100 µl de cada uno de los sueros problema, a una dilución 1/40, efectuada con PBS-Tween 20 que llevaba incorporado un 10% de suero fetal bovino (Gibco). La microplaca se incubaba a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de una nueva operación de lavado se añadía el inmunoconjugado (RASw/IgG (H + L)/PO, Laboratorios Nordic). Se distribuyó a razón de 100 µl por pocillo, tras diluirlo según su título, en PBS-Tween con suero fetal bovino. Tras cuatro lavados se incorporaban a la reacción 100 µl de sustrato (ácido 5-aminosalicílico, Merck) diluido en un tampón fosfato de pH 6,8 que llevaba agua oxigenada (Merck) en una concentración del 0,05%. Las placas se mantenían en oscuridad durante 18 horas, a temperatura ambiente. Antes de la lectura se añadían 100 µl de agua destilada a cada pocillo y se agitaba unos minutos para homogeneizar el color producido. La lectura se efectuaba a 490 nm.

Para la interpretación de los resultados se calculaba, en primer término, el VALOR ELISA, obtenido al restar del color producido por cada suero problema en presencia de antígeno (pocillos impares) el que surgía en los pocillos pares contiguos (color inespecífico producido por los sueros problema en ausencia de antígeno). Se consideraban positivos aquellos sueros con un valor ELISA igual o superior al VALOR UMBRAL, tomando como tal el valor ELISA medio de 41 sueros negativos + dos veces la desviación estándar²¹. A partir del valor umbral (que resultó de 46), se titularon los sueros de forma cualitativa⁷, mediante las denominaciones "bajo", "medio", "alto" y "muy alto", asignando un nuevo grado por cada veinte unidades de color obtenidas en la lectura espectrofotométrica.

En cada microplaca se incluía un blanco (al que se incorporaban todos los elementos de la reacción menos el suero problema), que era utilizado para poner a cero el lector, así como un suero positivo de referencia y uno negativo. Para considerar correcta la lectura, los valores ELISA de estos dos sueros debían mantenerse dentro de las absorancias esperadas.

AGLUTINACION

Para la elaboración del antígeno se emplearon los mismos serotipos que en las dos técnicas anteriores. Se siguieron los criterios proporcionados por Mittal¹⁶. Los crecimientos de dieciocho horas en agar chocolate se despegaban con solución salina y la

suspensión bacteriana resultante se calentaba durante 60 minutos a 56°C, para ser centrifugada posteriormente a 5.000 rpm. Una vez retirado el sobrenadante, se rellenaba con solución salina hasta el volumen inicial. Después de resuspender el "pellet" se ajustaba a una densidad óptica de 0,4, a 550 nm. Por último, se añadía formol comercial hasta una concentración final del 0,5% y se mantenía en refrigeración hasta el momento de su uso.

El protocolo utilizado fue el descrito para el diagnóstico de la brucelosis¹. La prueba se efectuaba en tubos de ensayo, en los que se diluían los sueros problema mediante la adición de solución salina fisiológica con 2-mercaptoetanol al 0,714%. El volumen de suero utilizado era 1 ml., del que se realizaban diluciones dobles seriadas, comenzando en 1/10. A cada tubo se agregaba 1 ml de la mezcla de la suspensión antigénica, sin diluir. Después de agitar, se procedía a su incubación durante 24 horas, a 37°C.

Se consideraba como título el recíproco de la dilución mayor en la que se apreciaba un aclaramiento del 50% en el tubo de ensayo, así como la formación de aglutinados en su fondo. Se incluían los correspondientes controles y dos sueros, positivo y negativo, de referencia.

El cálculo de la sensibilidad y especificidad comparadas entre técnicas se llevó a cabo mediante la fórmula indicada por Vizcaíno y Cambra²⁷.

El análisis estadístico de los resultados se efectuó empleando el paquete de programas BMDP, y dentro de él, un análisis de regresión al estar trabajando con variables cuantitativas.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras la utilización de las tres técnicas figuran en la Tabla 1. Como se puede comprobar, fue la técnica ELISA la que reveló un mayor número de sueros positivos, mientras que la que detectó el menor número fue la aglutinación.

TABLA 1
Resultados de las tres técnicas serológicas

SUEROS	TECNICAS		
	F.C.	ELISA	AGL. 2-ME
POSITIVOS	248(73,2%)	273(80,5%)	221(65,2%)
NEGATIVOS	90(26,5%)	66(19,5%)	118(34,8%)
ANTICOMPL.	1(0,3%)	—	—
TOTAL	339(100,0%)	339(100,0%)	339(100,0%)

COMPARACION DE F.C. Y ELISA

De los 339 sueros estudiados, 236 resultaron positivos por ambas técnicas (69,6%) y 54 negativos (15,9%), 12 (3,6%) fueron positivos por la primera y negativos por la

segunda. La circunstancia contraria se produjo en el 10,6% de las muestras. El suero anticomplementario se comportó de forma positiva por ELISA (Tabla 2).

TABLA 2
Comparación de los resultados obtenidos por F.C. y ELISA

FIJACION DEL COMPLEMENTO	ELISA		TOTAL
	POSITIVOS	NEGATIVOS	
POSITIVOS	236(69,6%)	12(3,6%)	248(73,2%)
NEGATIVOS	36(10,6%)	54(15,9%)	90(26,5%)
ANTICOMPL.	1(0,3%)	0	1(0,3%)
TOTAL	273(80,5%)	66(19,5%)	339(100,0%)

TABLA 3
Comparación de los títulos de los sueros positivos por ambas técnicas

FIJACION DEL COMPL.	ELISA				TOTAL
	Bajo (46-65)	Medio (66-85)	Alto (86-105)	Muy alto (> 105)	
10	12(5,1%)	6(2,5%)	1(0,4%)	0	19(8,0%)
20	20(8,5%)	29(12,3%)	5(2,1%)	0	54(22,9%)
40	26(11,0%)	28(11,9%)	12(5,1%)	1(0,4%)	67(28,4%)
80	19(8,5%)	29(12,3%)	18(7,6%)	10(0,4%)	66(28,4%)
160	5(2,1%)	13(5,5%)	8(3,4%)	1(0,4%)	27(11,4%)
320	0	1(0,4%)	1(0,4%)	0	2(0,8%)
640	0	0	1(0,4%)	0	1(0,4%)
TOTAL	82(35,2%)	106(44,9%)	46(19,4%)	2(0,8%)	236(100,0%)

La sensibilidad de la técnica ELISA fue del 95,2%, en comparación con la F.C.; la especificidad quedó rebajada hasta el 60,0%.

La distribución de los títulos positivos por ambas técnicas figura en la Tabla 3. El valor del coeficiente de correlación fue de 0,31. La ecuación de regresión que proporciona el título ELISA (y) conociendo el logaritmo del de la F.C. (x) es la siguiente:

$$y = 12,2138 x + 54,0887$$

COMPARACION DE F.C. Y A-2ME

Cerca del 51% de los sueros fueron positivos por ambas técnicas, el 12% negativos, el 22,4% positivos mediante F.C. y negativos mediante aglutinación y el 14,5% positivos por esta última y negativos por F.C. El suero anticomplementario resultó negativo en la aglutinación (Tabla 4).

TABLA 4
Comparación de los resultados obtenidos por ambas técnicas

FIJACION DEL COMPLEMENTO	AGLUT. CON 2-MERCAPTOETANOL		TOTAL
	POSITIVOS	NEGATIVOS	
POSITIVOS	172(50,7%)	76(22,4%)	248(73,1%)
NEGATIVOS	49(14,5%)	41(12,1%)	90(26,6%)
ANTICOMPL.	0	1(0,3%)	1(0,3%)
TOTAL	221(65,2%)	118(34,8%)	339(100,0%)

La sensibilidad de la A-2ME en relación con la F.C. fue del 69,3 y la especificidad, del 45,5%.

Los títulos de los sueros positivos para las dos técnicas se exponen en la Tabla 5; el coeficiente de correlación adquirió el valor 0,37. La ecuación que nos ofrece el título de la A-2ME (y), una vez conocido el alcanzado por F.C. (x) es:

$$y = 0,1479 + 22,7019$$

COMPARACION DE ELISA Y A-2ME

Ciento ochenta y seis sueros resultaron positivos por ambas (54,9%), treinta y uno negativos (9,1%) y 122 presentaron un comportamiento diferente: 87 fueron positivos por ELISA y negativos por aglutinación (25,7%), produciéndose la circunstancia contraria en 35 casos (10,3%). (Tabla 6).

La sensibilidad de la aglutinación en relación con la técnica ELISA ascendió hasta el 68,1%, manteniéndose la especificidad en un 47,0%.

La distribución de los sueros al comparar sus títulos aparece en la tabla 7. El coeficiente de correlación sólo alcanza el valor 0,12. La recta que figura a continuación

TABLA 5
Comparación de los títulos de los sueros positivos obtenidos por ambas técnicas

FIJACION DEL COMPL.	AGLUTINACION CON 2-MERCAPTOETANOL					TOTAL
	10	20	40	80	160	
10	5(2,9%)	7(4,1%)	3(1,7%)	0	0	15(8,7%)
20	9(5,2%)	11(6,4%)	10(5,8%)	2(1,2%)	0	32(18,6%)
40	16(9,3%)	14(8,1%)	18(10,5%)	3(1,7%)	1(0,6%)	52(30,2%)
80	13(7,6%)	17(9,9%)	13(7,6%)	8(4,7%)	0	51(29,8%)
160	4(2,3%)	3(1,7%)	7(4,1%)	4(2,3%)	1(0,6%)	19(11,0%)
320	0	0	0	1(0,6%)	1(0,6%)	2(1,2%)
640	0	0	0	1(0,6%)	0	1(0,6%)
TOTAL	47(27,3%)	52(30,2%)	51(29,7%)	19(11,1%)	3(1,8%)	172(100,0%)

TABLA 6
Comparación de los títulos de los sueros positivos obtenidos por ambas técnicas

	AGLUT. CON 2-MERCAPTOETANOL		TOTAL
	POSITIVOS	NEGATIVOS	
ELISA			
POSITIVOS	186(54,9%)	87(25,7%)	273(80,5%)
NEGATIVOS	35(10,3%)	31(9,1%)	66(19,5%)
TOTAL	221(65,2%)	118(34,8%)	339(100,0%)

predice el logaritmo del título obtenido por aglutinación (y), conociendo el correspondiente a la técnica ELISA (x):

$$y = 0,0027 x + 1,1876$$

DISCUSION

De los resultados obtenidos se desprende una alta sensibilidad de la técnica ELISA en relación con la F.C. Aunque la especificidad pueda parecer, en principio, no dema-

TABLA 7

Comparación de los títulos de los sueros positivos obtenidos por ambas técnicas.

TITULOS ELISA	AGLUTINACION CON 2-MERCAPTOETANOL					TOTAL
	10	20	40	80	160	
Bajo (46-65)	17(9,1%)	21(11,3%)	12(6,5%)	2(1,1%)	0	52(28,0%)
Medio (66-85)	24(12,9%)	24(12,9%)	32(17,2%)	11(5,9%)	1(0,5%)	92(49,5%)
Alto (86-105)	13(7,0%)	11(5,9%)	7(3,8%)	7(3,8%)	2(1,1%)	40(21,5%)
Muy Alto (105)	0	0	2(1,1%)	0	0	2(1,1%)
TOTAL	54(29,0%)	56(30,1%)	53(28,5%)	20(10,8%)	3(1,6%)	186(100,0%)

siado alta (60%), debemos tener en cuenta que en la fórmula que hemos empleado la elevación de la sensibilidad conlleva una disminución de la especificidad ya que, para alcanzar un porcentaje del 100% ambas técnicas deberían haberse comportado de igual forma. Nuestro porcentaje es bastante inferior al obtenido por Morrison *et al.* ¹⁹, que detectan una especificidad relativa del ELISA del 82%, pero con la salvedad de que ellos consideran tan sólo los sueros positivos por ambas técnicas, mientras que nosotros no basamos, precisamente, en la diferencia de positivos y negativos.

La sensibilidad superior del ELISA se ve corroborada por el hecho de que la mayoría de los sueros positivos por ambas técnicas presentan títulos superiores, o como mínimo iguales. También porque mediante el enzimoimmunoensayo hemos detectado en su mayoría IgG, en tanto que la F.C. no presenta esta limitación. De todos modos, el valor revelado por el coeficiente de correlación indica que, aún proporcionando mejores rendimientos el ELISA, la relación entre ambas pruebas es considerable ⁴, por lo que la F.C. no debe ser considerada una técnica sustancialmente peor.

Otra causa de disparidad podría ser la subjetividad de la lectura de la F.C. a la hora de interpretar el grado de hemólisis ¹⁹ aunque, a nuestro entender, influiría más sobre los títulos de los sueros positivos que sobre la tasa de anticuerpos. Igualmente, el tipo de preparado antigénico, diferente en los dos casos, ya que para el ELISA empleamos un antígeno hervido que, en opinión de Mittal *et al.* ¹⁸ liberaría componentes capsulares más antigénicos que el manejado en la F.C.

En relación con los resultados ofrecidos por F.C. y A 2-ME diremos que la sensibilidad de esta última disminuyó ostensiblemente, en relación con la técnica inmunoenzimática, al situarse en el 69,3%. Otro tanto sucedió con la especificidad. La comparación de la aglutinación con el ELISA pone de manifiesto porcentajes similares de especificidad y sensibilidad. En cuanto a los títulos proporcionados por los sueros positivos, en el caso de la comparación entre A 2-ME y F.C. se comprueba que su relación es considerable, aunque la segunda demostraría títulos más elevados. De la comparación de los correspondientes a A 2-ME y ELISA se observa, por el contrario, que el coefi-

ciente de correlación denuncia una relación muy escasa, lo que se traduce en una eficiencia muy superior del enzimoimmunoensayo.

Una explicación de la reducida sensibilidad de la A 2-ME (aunque sólo válida para su comparación con la F.C.) podría ser que detecta en su mayoría IgG, al verse destruidos los puentes disulfuro de las IgM por el 2-mercaptoetanol ²⁴. Otros inconvenientes adicionales serían la interpretación subjetiva y dificultosa de los resultados y la imposibilidad de procesar un elevado número de muestras en un reducido margen de tiempo, al no permitir la mecanización propia de las técnicas adaptadas a microplaca.

Por lo tanto, podemos afirmar que la A 2-ME proporciona sensibilidades y especificidades bajas, inferiores a las de las otras dos técnicas contrastadas, por lo que no la consideramos útil para el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina. De este modo, discrepamos de los resultados presentados por Goyette *et al.* ⁷, que la encuentran tan sensible y específica como la F.C. e incluso, más precoz a la hora de detectar niveles de anticuerpos. Coincidimos, no obstante, cuando señalan que la técnica ELISA es la más fiable y eficaz de las tres.

Sin embargo, al no alcanzar (aunque por poco) sensibilidades del 100% creemos que debe seguir perfeccionándose y que, al objeto de tener una conciencia más exacta de la situación inmune de una cabaña porcina determinada, se deben combinar varias técnicas serológicas, especialmente en el caso de estudios individualizados ⁶, o para el diagnóstico de procesos crónicos como los de nuestra región ^{8, 9}.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a M.^a José García Iglesias su asesoramiento en la parte estadística y a "Laboratorios Ovejero, S.A." la provisión de material imprescindible para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALTON, G.G.; JONES, L.M. & PIETZ, D.E. (1976). *Las técnicas de Laboratorio en la Brucelosis*. Ed. OMS. Ginebra: 120-121.
- 2) BUNKA, S. (1987). Direct demonstration of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* in lungs in swine. *Inaugural-Dissertation*, Tierärztliche Hochschule, Hannover, 68 pp.
- 3) CHANG, W.M. & LAI, S.S. (1988). Comparison of antigenic compositions of different serotypes of swine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Proc. 10th IPVS Congr.*, Rio de Janeiro, Brazil: 77.
- 4) COLTON, T. (1979). *Estadística en Medicina*. Ed. Salvat. Barcelona: 217.
- 5) ELAZHARY, M.A.S.Y.; DEA, S.; MITTAL, K.R. & HIGGINS, R. (1985). Prevalence of antibodies to swine influenza virus, porcine adenovirus type 4 and *Haemophilus pleuropneumoniae* in Quebec pig farms with respiratory problems. *Can. Vet. J.*, 26: 190-192.
- 6) GOYETTE, G.; LARIVIERE, S.; MITTAL, K.R. & HIGGINS, R. (1986). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodetection of pigs exposed to *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Proc 9th I.P.V.S. Congr.*, Barcelona, Spain: 256.
- 7) GOYETTE, G.; LARIVIERE, S.; MITTAL, K.R.; HIGGINS, R. & MARTINEAU, G.P. (1986). Comparison of CFT, ELISA an tube agglutination test with 2-ME in pigs from herds with o without *Haemophilus pleuropneumoniae* infection. *Proc. 9th IPVS Congr.*, Barcelona, Spain: 258.
- 8) GUTIERREZ MARTIN, C.B.; SUAREZ ESTRADA, J.; LLANOS PELLITERO, A.; TASCÓN CABRERO, R.I. & RODRIGUEZ FERRI, E.F. (1989). Situación inmune de poblaciones porcinas de Castilla y León, frente a la infección natural por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Actas del XII Congreso de la S.E.M.*, Pamplona: 107.

- 9) GUTIERREZ MARTIN, C.B.; TASCÓN CABRERO, R.I.; SUAREZ ESTRADA, J. & RODRIGUEZ FERRI, E.F. (1989). Estudio de la pleuroneumonía porcina en la provincia de León. I. Encuesta serológica en poblaciones porcinas con problemas de pleuroneumonía. En prensa.
- 10) HSU, F.S.; HU, H. & RO, L.H. (1982). Pathogenesis of pleuropneumonia in swine caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*: Pathologic, immunofluorescent and bacteriological studies. *Proc. 7th IPVS Congr.*, México City: 78.
- 11) IBARGOYEN, G.S.; PERFUMO, C.J.; MASSONE, A.R.; GIMENO, E.J. & MARTIN, A.A. (1988). Demonstration of *Haemophilus pleuropneumoniae* in histological sections by immunoperoxidase techniques. *Proc. 10th IPVS Congr.*, Rio de Janeiro, Brazil: 72.
- 12) LARIVIERE, S. (1986). Comunicación personal.
- 13) MACKAY, D.K.J.; BORTHWICK, N.J. & MACKENZIE, N.M. (1988). The interaction of maternal immunity and vaccination in protection against *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Proc. 10th IPVS Congr.*, Rio de Janeiro, Brazil: 84.
- 14) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R. & LARIVIERE, S. (1983). Determination of antigenic specificity and relationship among *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes by an indirect hemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 17(5): 787-790.
- 15) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R. & LARIVIERE, S. (1983). Identification and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by coagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 18(6): 1.351-1.354.
- 16) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R.; LARIVIERE, S. & LEBLANC, D. (1984). A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 45(4): 715-719.
- 17) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R.; LARIVIERE, S. & MARTINEAU, G.P. (1984). Rapid diagnosis and serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the lungs by coagglutination and ring precipitation tests. *Proc. 8th IPVS Congr.*, Ghent, Belgium: 101.
- 18) MITTAL, K.R.; HIGGINS, R.; LARIVIERE, S. & MARTINEAU, G.P. (1987). Effect of heat treatment on the surface antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Rec.*, 120:62-65.
- 19) MORRISON, R.B.; VHDAT, F.; HILLEY, H.D.; PIJOAN, C. & HILL, H.T. (1984). Detección de anticuerpos contra *Haemophilus pleuropneumoniae* por un sistema ELISA utilizando un antígeno tratado por el calor. *Proc. 8th IPVS Congr.*, Ghent, Belgium: 118.
- 20) MULKS, M.H.; HUNTER-SIMON, D.Y.; SPRAGUE, J.W. & THACKER, B.J. (1986). Identification of immunogenic outer membrane proteins of *Haemophilus pleuropneumoniae* in infected swine. *Proc. 9th IPVS Congr.*, Barcelona, Spain: 266.
- 21) NICOLET, J.; PAROZ, Ph.; 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(12): 2.319-2.142.
- 22) OHISHI, K.; KOEDA, T.; SUZUKI, S. & MURAMATSU, M. (1987). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen by immunoperoxidase staining in pulmonary lesions of pigs inoculated with *A. pleuropneumoniae*. *Ann. Rep. Natl. Vet. Assay Lab.*, 24: 21-26.
- 23) PIJOAN, C. (1984). Etiología, inmunidad y patogenia de las enfermedades respiratorias del cerdo. *Med. Vet.*, 1(11): 517-524.
- 24) PIJOAN, C. (1985). Serology and immunology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. In: Schultz, R.A. *Haemophilus pleuropneumoniae Compendium*. Biotech Corporation SDS. Avoca. Iowa: 23.27.
- 25) RAPP, V.J.; ROSS, R.F. & ZIMMERMANN ERICKSON, B. (1985). Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 46(1): 185-192.
- 26) RO, L.H. (1987). Protective immunogenic efficacy of capsule antigens of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.*, 13(2): 119-126.
- 27) SANCHEZ-VIZCAINO, J.M. & CAMBRA ALVAREZ, M. (1987). *Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en Patología Animal y Vegetal*. Publicación del I.N.I.A. Madrid.
- 28) SHOPE, R.E. (1964). Porcine contagious pleuropneumonia. I. Experimental transmission, etiology and pathology. *J. Exp. Med.*, 119: 357-368.
- 29) UDEZE, F.A. (1987). *Role of virulence determinants of Haemophilus pleuropneumoniae in the pathogenesis of porcine pleuropneumoniae*. Doctoral Thesis. Georgia.

CARACTERIZACION DE LOS PATOVAR DE *ESCHERICHIA COLI* DE ORIGEN PORCINO EN LA PROVINCIA DE SALAMANCA

(CHARACTERIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* PATOVARS FROM PORCINE ORIGIN IN THE PROVINCE OF SALAMANCA)

Por M.A. Jiménez Vicente

Palabras clave: *E. coli*, diarrea porcina, patovar.
Key words: *E. coli*, porcine diarrhea, patovar.

SUMMARY

A study on *E. coli* from piglets diarrhea and healthy sows was performed. The isolation and characterization, serotyping, fimbriae, antibiotics resistance, enterotoxins production, biovars and plasmid profile show the existence of specific serovar not typable with the classical antisera, which is associated to K88 fimbrial antigen as so 987P pilus together to the ordinary 0147, 0141 and 0149, forming patovars STa associated.

RESUMEN

Se ha llevado a cabo un estudio sobre cepas de *Escherichia coli* aisladas de lechones sanos y diarreicos, así como de reproductoras sanas. El estudio comprende el aislamiento y caracterización, serotipado, fimbriaciones, resistencia a antibióticos, producción de toxinas, determinación del biovar y perfil plasmídico de las mismas.

Los resultados muestran la existencia de un serovar mayoritario no tipificable con los antisueros usuales, que se asocia a fimbrias K88 y/o 987P, seguido en frecuencia de los comunes 0147, 0141 y 0149 dando lugar a patovar productores de STa.

Dpto. de Patología Animal (Sanidad Animal). Unidad de Microbiología e Inmunología. Universidad de León.

An. Fac. Vet. León, 1989, 35, 137-146