

Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1 de pulmones de cerdo con y sin lesiones neumónicas utilizando la técnica de inmunohistoquímica

Rigoberto Hernández-Castro*
Gilberto Chávez-Gris**
José Ángel Gutiérrez-Pabello*

Abstract

In the present study the avidin-biotin-peroxidase complex was used for the detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1, serotype 1, and results were compared with bacterial isolation. Lungs from 100 clinically healthy pigs were collected at a slaughterhouse, 50 had apparent pneumonic lesions while 50 had no gross lung lesions. All samples were examined by histopathological, bacteriological and immunohistochemical methods. Predominant microscopic lesions were bronchopneumonia (30%) and interstitial pneumonia (20%). The immunohistochemical technique identified the presence of *A. pleuropneumoniae* in 75 lungs, whereas bacteriology only detected this microorganism in 11 samples. Statistical analysis showed a significant difference ($P < 0.001$) in the rate of bacterial identification. Immunohistochemistry may be a good alternative in the routine diagnosis of swine pleuropneumonia.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, IMMUNOHISTOCHEMISTRY, SWINE PLEUROPNEUMONIA.

Resumen

En el presente estudio se comparó el aislamiento bacteriológico y una técnica de inmunohistoquímica con la variedad del complejo avidina-biotina-peroxidasa para la identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1. Se utilizaron 100 pulmones de cerdos clínicamente sanos sacrificados en rastro, 50 con lesiones macroscópicas aparentes y 50 sin lesiones macroscópicas. Todas las muestras se analizaron mediante histopatología, bacteriología e inmunohistoquímica. Las lesiones microscópicas que predominaron en el total de los pulmones fueron bronconeumonía (30%) y neumonía intersticial (20%). *Actinobacillus pleuropneumoniae* fue identificado en 75 pulmones mediante inmunohistoquímica, mientras que a través de bacteriología sólo se detectó el microorganismo en 11 pulmones. El análisis estadístico demostró una diferencia significativa ($P < 0.001$) entre los resultados obtenidos por ambas pruebas. El uso de la prueba de inmunohistoquímica en el diagnóstico rutinario de la pleuroneumonía porcina puede ser buena alternativa.

Palabras clave: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, INMUNOHISTOQUÍMICA, PLEURONEUMONÍA PORCINA

Recibido 14 de enero de 2002 y aceptado el 27 de junio de 2002.

* Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

** Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Correspondencia: Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Teléfono: 5622-5896. Fax: 5622-5971. E-mail: jagp@servidor.unam.mx

Introducción

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pleuropneumoniae*) es el agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP). Esta enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo y causa importantes pérdidas económicas. Existen dos biotipos de *A. pleuropneumoniae* con base en sus requerimientos de dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD o factor V). Los aislamientos del biotipo 1 requieren NAD, mientras que los aislamientos del biotipo 2 son NAD independientes. Hasta el momento se han descrito 15 serotipos del biotipo 1 y 6 del biotipo 2, con base en sus antígenos capsulares.¹⁻³

La infección propicia a una enfermedad respiratoria cuya presentación puede ser aguda o crónica dependiendo de diferentes factores como: inmunidad de la pira, vacunación, medicación y condiciones ambientales.^{4,5} La forma aguda de la enfermedad se caracteriza por hemorragia extensiva y deposición de fibrina en los pulmones. En animales infectados crónicamente, el organismo puede quedar secuestrado en lesiones necróticas pulmonares, y puede ser recuperado de tonsilas y de las vías respiratorias altas.^{6,7} Los signos clínicos, la historia de la pira y las lesiones macroscópicas son base para el diagnóstico; sin embargo, la identificación completa del microorganismo requiere el aislamiento bacteriano y serotipificación. El uso de pruebas serológicas es fundamental para la identificación de portadores asintomáticos, responsables de la diseminación de la enfermedad en piras no infectadas.^{8,9} Las técnicas inmunológicas directas como inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (IHQ) representan otra opción para el diagnóstico de la PCP. Estas técnicas tienen como base la identificación de antígenos, serotipo y biotipo específicos en tejidos frescos, congelados o fijados en formol e incluidos en bloques de parafina.¹⁰⁻¹² El objetivo de este estudio fue comparar el aislamiento bacteriano y la prueba de IHQ en la identificación de *A. pleuropneumoniae* de pulmones de cerdos clínicamente sanos con o sin lesiones neumónicas.

Material y métodos

Muestras

Los pulmones de 100 cerdos clínicamente sanos fueron obtenidos de un rastro de la periferia de la ciudad de México. El material fue recolectado en diferentes visitas al rastro, los animales provenían de granjas localizadas en diferentes estados del país (Querétaro, Jalisco, Estado de México y Sonora). La presencia o ausencia de lesiones neumónicas fue el criterio para recolectar las muestras. Se seleccionaron 50 pulmones con lesiones neumónicas, así como 50 sin lesiones aparentes. Las lesiones que caracterizaron al grupo con lesiones neumónicas en el presente estudio incluyeron; congestión, hemorragia, edema, pleuritis, abscesos y áreas de consolidación, las muestras fueron obtenidas sin considerar la extensión y localización de las mismas como una limitante.

Aislamiento bacteriano

Se tomó una muestra de tejido normal o con lesiones neumónicas. Las muestras fueron inoculadas en agar sangre con una estría de *Staphylococcus aureus* para proveer el factor V. Las placas fueron incubadas durante 24 h a 37°C bajo condiciones de microaerobiosis. Las colonias sospechosas fueron transferidas a cajas con agar tripticosa soya (TSA) suplementado con 10 µg/ml de NAD* y 1% de suero fetal bovino** que posteriormente fueron incubadas durante 24 h a 37°C bajo condiciones de microaerobiosis. La identificación final de las colonias sospechosas a *A. pleuropneumoniae* fue obtenida mediante el uso de pruebas bacteriológicas de rutina como tinción de Gram, oxidasa, catalasa, ureasa de Christensen, reacción a la prueba de CAMP, satelitismo en presencia de la cepa nodriza de *S. aureus* y dependencia de factores de crecimiento utilizando discos impregnados con factor X, V o X+V.^{*13}

* Sigma Chemical, St. Louis Missouri, USA.

** In Vitro S.A., México, D. F.

* Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England.

** Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, California, USA.

Histopatología

Las muestras de pulmón para histopatología fueron fijadas en forma lina amortiguada (pH 7.2) al 10% y procesadas con la técnica de inclusión en parafina. Se cortaron secciones de 9 m y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). Las lesiones microscópicas fueron examinadas por dos diferentes patólogos.

Inmunohistoquímica

Los antígenos bacterianos fueron detectados por el método de avidina-biotina-peroxidasa** siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron anticuerpos policlonales, producidos por conejos en nuestro laboratorio, contra células completas de *A. pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1, como anticuerpo primario a una dilución de 1:1500 y como anticuerpo secundario se utilizó una anti-IgG de conejo biotinilada. Los antígenos o restos antigénicos de *A. pleuropneumoniae* fueron identificados de color café oscuro, utilizando el cromógeno diaminobencidina (DAB). Posteriormente, las muestras fueron teñidas con hematoxilina de Harris como colorante de contraste. Se usaron secciones de tejido pulmonar de cerdos inoculados experimentalmente con *A. pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1, y de cerdos sanos libres de *A. pleuropneumoniae* como testigos positivo y negativo, respectivamente.

Para evaluar la especificidad del antisuero se confrontaron los frotis bacterianos de *Pasteurella multocida* serotipos A y D, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* y *A. pleuropneumoniae* serotipos 1, 5, 9 y 11 con el anticuerpo policlonal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el paquete comercial Stat-view.*** Se utilizó el análisis de Ji-cuadrada para comparar los resultados del aislamiento bacteriano y de inmunohistoquímica, valores de $P < 0.05$ fueron estadísticamente significantes.

Resultados

Aislamiento bacteriano y estudio histopatológico

Once aislamientos de *A. pleuropneumoniae* fueron recuperados de 100 pulmones de cerdos sacrificados en rastro. Nueve aislamientos provenían de pulmones con lesiones macroscópicas compatibles con neumonía que estaban afectados entre 15% y 30% del parénquima, y dos aislamientos se realizaron a partir de pulmones sin lesiones microscópicas aparentes. Las lesiones macroscópicas se presentaron en 23 ocasiones en los lóbulos craneales, 22 veces en los lóbulos medios y 19 veces en los lóbulos caudales. La mayoría de los aislamientos (seis) se recuperaron de lesiones en los lóbulos craneales; sin embargo, también se recuperó al microorganismo de los lóbulos caudales (tres aislamientos). Seis de los aislamientos procedentes de pulmones con lesiones macroscópicas fueron recuperados de áreas que histopatológicamente presentaron bronconeumonía abscedativa con pleuritis y tres cultivos fueron obtenidos de pulmones que sólo mostraron lesiones hemorrágicas, así como fibrosis. De los aislamientos obtenidos de pulmones sin lesiones macroscópicas aparentes, en un caso el estudio histopatológico evidenció una bronconeumonía supurativa con pleuritis, mientras que el segundo aislamiento provino de una zona de pulmón que sólo mostró hemorragia (Cuadro 1). La mayoría de los aislamientos provenían del Estado de México, siete de los pulmones con lesiones y dos sin lesiones aparentes; y los dos restantes de los estados de Querétaro y Jalisco, respectivamente, (Cuadro 2).

En los pulmones con lesiones compatibles con neumonía, pero negativos al aislamiento, se observaron áreas de consolidación que abarcaron entre 3% y 15% del parénquima pulmonar e histopatológicamente presentaron bronconeumonía supurativa (14%), bronconeumonía no supurativa (16%), neumonía intersticial (12%), pleuritis no supurativa (6%), bronquitis (6%), hemorragias y edema (28%). Asimismo, de los pulmones sin lesiones macroscópicas aparentes y con aislamiento negativo, el estudio histopatológico demostró la presencia de neumonía intersticial discreta (28%), bronconeumonía supurativa discreta (10%), pleurobronconeumonía crónica (4%), pleuroneumonía supurativa discreta

*** Apple Computer, Inc., California, USA.

(4%), bronquitis no supurativa (4%), pleurobronconeumonía supurativa (2%), y lesiones hemorrágicas asociadas a edema (4%). Estos datos se resumen en el Cuadro 1.

Inmunohistoquímica

El antisuero de *A. pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1, no reaccionó contra ninguna de las bacterias utilizadas en este estudio. En relación a los serotipos de *A. pleuropneumoniae*, solamente se detectó reacción cruzada con el serotipo 9. Sin embargo, esta reacción entre serotipos 1 y 9 ha sido previamente notificada. *A. pleuropneumoniae* fue observado como cocobacilo de color café en forma individual o en grupos en el lumen de los vasos sanguíneos, alvéolos, bronquios, bronquiolos, y en el citoplasma de macrófagos alveolares (Figura 1). Los antígenos de *A. pleuropneumoniae* fueron identificados en 75 de las 100 muestras de pulmones. En 43 casos la identificación de *A. pleuropneumoniae* fue obtenida de pulmones con lesiones macroscópicas que al estudio histopatológico presentaron lesiones de neumonía intersticial (12%), bronconeumonía no supurativa (18%), bronconeumonía supurativa (14%), pleuritis no supurativa (6%), bronquitis no supurativa (6%) y hemorragias y edema (30%); nueve de estos casos también fueron positivos al aislamiento bacteriano. En 32 ocasiones la identificación de los restos antigénicos de *A. pleuropneumoniae* coincidieron con pulmones sin lesiones macroscópicas aparentes, pero que al analizarlos a nivel histológico presentaron lesiones de neumonía intersticial (24%), pleuroneumonía supurativa (4%), pleurobronconeumonía supurativa (14%), bronquitis (2%) y hemorragias y edema (20%), en dos de estos casos se realizó aislamiento bacteriano. En el Estado de México se notificaron más casos positivos por IHQ, 31 en total. De éstos, 15 fueron asociados con pulmones neumónicos y 16 sin lesiones. Querétaro fue el estado con más casos positivos a IHQ a partir de pulmones con lesiones neumónicas con 19 (Cuadro 2).

Análisis estadístico

Resultados del aislamiento bacteriano y de IHQ mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$). Los resultados del cuadro de contingencia utilizando un intervalo de confianza para dos proporciones con 95% de confianza fue el siguiente: Ji-cuadrada = 83.55 ($P < 0.001$), g estadística = 91.55, coeficiente de contingencia = 0.543 y la correlación de continuidad para Ji-cuadrada fue de 80.967 ($P < 0.001$).

Discusión

En el presente estudio la IHQ identificó la presencia de *A. pleuropneumoniae* en 75% de las muestras, mientras que el aislamiento bacteriano detectó al microorganismo en sólo 11% de los casos. Los resultados no coinciden con la información previamente publicada por Ibargoyen *et al.*,¹⁴ Ohishi *et al.*,¹⁵ y Gutiérrez *et al.*,¹⁶ los cuales notifican 100% y 95% de reacciones positivas utilizando IHQ y aislamiento bacteriano, respectivamente. Sin embargo, los experimentos fueron realizados en cerdos inoculados experimentalmente, mientras que los resultados de este estudio fueron obtenidos de animales clínicamente sanos, que quizá se infectaron de forma natural.

La proporción de reacciones positivas en el grupo de pulmones con lesiones macroscópicas fue más alto (86%) que el grupo sin lesiones macroscópicas aparentes pero que presentaban lesiones a nivel histológico (64%), de cualquier forma, el número de animales con la presencia del microorganismo en ambos grupos fue alto, se sugiere un estado de infección subclínica de las piasas.

El análisis histopatológico evidenció que sólo 6% de las muestras presentaban lesiones compatibles con pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP), lo cual difiere de estudios previos que describen la asociación de estas lesiones con infecciones experimentales. La diferencia podría atribuirse al hecho de que cerdos infectados naturalmente desarrollan lesiones pulmonares más discretas o de curso crónico, que además están asociadas a infecciones mixtas con otros patógenos que modifican las lesiones características de la PCP.

Es importante señalar que aunque 15 de 24 muestras de Sonora fueron clasificadas como positivas por IHQ, los pulmones procedentes de este estado no presentaron lesiones aparentes y el aislamiento bacteriano fue negativo en todas las muestras.

Estos resultados pueden atribuirse al hecho que las granjas porcícolas de Sonora son altamente tecnificadas y llevan a cabo diferentes prácticas sanitarias, como tratamiento con antibióticos al tiempo de destete que reduce, pero no erradica, la presencia de la bacteria, así como programas de erradicación contra enfermedades como Aujeszky, que juegan un papel predisponente en la presentación clínica de la PCP.

A. pleuropneumoniae no es un habitante normal del aparato respiratorio del cerdo, su presencia en tejidos es capaz de causar enfermedad clínica e infecciones fatales en animales no sometidos a estrés. El microorganismo se encuentra presente en tejidos de animales enfermos o en cerdos que se han recuperaron de la infección. El hecho de que 75% de las muestras fueran positivas a *A. pleuropneumoniae* sugiere la presencia de un alto número de portadores sanos, respaldando la idea de que la mayoría de las pjaras a nivel mundial están endémicamente infectadas con *A. pleuropneumoniae* y sólo una pequeña proporción de granjas presenta cerdos con la enfermedad clínica.¹⁷

El control y prevención de la PCP requiere, en la mayoría de los casos, la completa identificación del microorganismo. Si bien la vía tradicional para demostrar la presencia de *A. pleuropneumoniae* es el aislamiento bacteriano y la serotipificación, estos procedimientos consumen demasiado tiempo y no son muy sensibles. Los resultados de este estudio demuestran que la IHQ es mucho más sensible en la identificación de *A. pleuropneumoniae* que el aislamiento bacteriológico en cerdos infectados naturalmente. Todas esas observaciones sirven como base para recomendar el uso de IHQ como una buena alternativa en el diagnóstico de rutina de la PCP.

Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 1, serotype 1 from pig lungs with and without pneumonic lesions using an immunohistochemical technique.

Rigoberto Hernández-Castro*
Gilberto Chavez-Gris**
Jose Angel Gutiérrez-Pabello*

Introduction

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pleuropneumoniae*) is the aetiologic agent of porcine contagious pleuropneumonia (PCP). The disease is distributed worldwide, causing severe economic loss. A number of capsular serotypes and 2 biotypes have been identified, isolates of biotype 1 require nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) and may be classified into 15 serotypes, whereas biotype 2 isolates are NAD-independent and are distributed into 6 serotypes.¹⁻³ Infection results in respiratory disease that could be acute or chronic depending on different factors, such as: herd immunity, vaccination, medication and environmental conditions.^{4,5} The acute form of the disease is characterized by extensive hemorrhage and fibrin deposition in the lungs. In chronically infected animals, the organism may be sequestered in the lungs in necrotic lesions and it can be recovered from the tonsils and upper respiratory tract.^{6,7} Clinical signs, herd history and macroscopic lesions are the basis for diagnosis, however, the complete identification of the microorganism requires bacterial isolation and serotyping. The use of serological tests is fundamental for the identification of healthy carriers which are responsible for spreading the disease to non-infected herds.^{8,9} Direct immunological techniques like immunofluorescence and immunohistochemistry (IHQ) represent another option for the diagnosis of PCP. These techniques are based on the identification of antigenic residues which are serotype and biotype specific in fresh, frozen or even formalin-fixed and paraffin-embedded tissues.¹⁰⁻¹² The aim of this study was to compare bacterial isolation and immunohistochemistry in the identification of *A. pleuropneumoniae* from lungs of clinically healthy pigs with and without pneumonic lesions.

Material and methods

Lung samples. Lungs from 100 clinically healthy pigs were obtained from a slaughterhouse from the Mexico City area. The material was collected on different visits to the slaughterhouse, the animals came from farms located in different states in Mexico (Queretaro, Jalisco, State of Mexico and Sonora). The presence or absence of pneumonic lesions was the criteria followed to collect the tissues. Therefore, 50 lungs with pneumonic lesions, as well as 50 lungs without apparent macroscopic lesions were selected. Lesions that characterized the pneumonic group in the present study included: congestion, hemorrhages,

* Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

** Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Correspondencia: Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Teléfono: 5622-5896. Fax: 5622-5971. E-mail: jagp@servidor.unam.mx

edema, pleuritis, abscesses and consolidation areas; samples were obtained regardless of the size and location in the parenchyma.

Bacterial isolation. A tissue sample was selected either from a pneumonic or normal area and was inoculated in blood agar, a β -haemolytic *Staphylococcus aureus* was streaked across the cultures to provide V factor (NAD). Plates were incubated during 24 h at 37°C under microaerobic conditions. *A. pleuropneumoniae* suspected colonies were transferred to trypticase soy agar plates supplemented with 10 µg/ml of NAD* and 1% of fetal calf serum** which were then incubated during 24 h at 37°C under microaerobic conditions. Bacterial identification was accomplished using standard bacteriological techniques such as: Gram stain, oxidase, catalase, Christensen urease, CAMP reaction, satellitism beside a *S. aureus* streak, as well as factor dependency on nutrient agar using X, V, and X+V factor discs***.13

Histopathology. Lung samples for histopathology were taken, fixed in 10% formaline-buffered saline (pH 7.2) and embedded in paraffin wax. Sections of 5 µ were cut and stained with haematoxylin and eosin (H&E). Microscopic lesions were examined by two different pathologists.

Immunohistochemistry. Bacterial antigens were detected by the avidin-biotin-peroxidase complex* method following the manufacturer's instructions. Polyclonal antibodies produced in rabbits in our laboratory, against *A. pleuropneumoniae* biotype 1, serotype 1 whole cells, were used as primary antibodies at 1:1500 dilution while biotinylated anti-rabbit IgG were used as a secondary antibody. *A. pleuropneumoniae* antigenic residues were identified using diaminobenzidine (DAB) chromogen on dark brown color. Sections were counter-stained with Harry's haematoxyline. Lung tissue sections from experimentally infected and healthy non *A. pleuropneumoniae* infected pigs were used as positive and negative controls, respectively. Bacterial smears from *Pasteurella multocida* types A and D, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* and *A. pleuropneumoniae* serotypes 1, 5, 9 and 11 were confronted with the *A. pleuropneumoniae* serotype 1 polyclonal antibodies to evaluate the specificity of the antiserum.

Statistical analysis. Data were analysed using the Stat-view commercial program**. Chi-square test was used to compare the results from immunohistochemistry and bacterial isolation, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Bacterial isolation and histopathology. *A. pleuropneumoniae* was isolated from 11 out of 100 lungs. In two occasions, the isolates came from lungs without lesions, whereas nine isolates were associated with macroscopic lesions of pneumonia that covered 15-30% of the lung parenchyma. Macroscopic lesions were distributed in 23 lungs at the cranial lobules, 19 at mediastinal lobules and on 22 occasions at the caudal lobules. Most of the isolates (6) came from lesions located at the cranial lobules, however on three occasions it was possible to recover the microorganism from the caudal lobules. Histopathology analysis evidenced that six out of nine isolates that came from lungs with macroscopic lesions were recovered from areas that presented abscedative bronchopneumonia with pleuritis, while three of nine isolates came from areas with hemorrhages and fibrosis. Isolates from lungs with no gross lesions were obtained from regions with suppurative bronchopneumonia with pleuritis in one occasion and in the second case, from an area with hemorrhages (Table 1). Most of the isolates came from the State of Mexico, seven from pneumonic

* Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA.

** In Vitro S.A., Mexico, D.F.

*** Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England

* Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, California, USA.

** Apple Computer, Inc., California, USA.

lungs and two from lungs with no lesions; the remaining isolates came from Queretaro (1) and Jalisco (1); Table 2 summarizes the results. Lungs with macroscopic lesions, but negative to isolation, showed 3-15% of the parenchyma with consolidation areas, the histopathology findings revealed suppurative bronchopneumonia (14%), non-suppurative bronchopneumonia (16%), interstitial pneumonia (12%), non-suppurative pleuritis (6%), bronchitis (6%), hemorrhages and edema (28%). On the other hand, histopathology from lungs without macroscopic lesions and negative to isolation showed the presence of discrete interstitial pneumonia (28%), discrete suppurative bronchopneumonia (10%), chronic pleurobronchopneumonia (4%), discrete suppurative pleuropneumonia (4%), non-suppurative bronchitis (4%), suppurative pleurobronchopneumonia (2%), hemorrhages and edema (4%). Table 1 summarizes the results.

Immunohistochemistry. *A. pleuropneumoniae* serotype 1 polyclonal antibodies did not react with any of the related bacteria used in this study. As regards *A. pleuropneumoniae* serotypes, the only cross reaction detected was associated to the presence of serotype 9. The cross reaction between serotypes 1 and 9 is well documented. *A. pleuropneumoniae* was observed as brownish coccobacilli occurring in clusters or individually in the lumen of blood vessels, alveoli, bronchi, bronchioli and in the alveolar macrophage cytoplasm (Fig. 1). *A. pleuropneumoniae* antigens were identified in 75 out of 100 lung samples. In 43 cases, the identification was obtained from lungs with macroscopic lesions associated with the following histopathology findings, interstitial pneumonia (12%), non-suppurative bronchopneumonia (18%), suppurative bronchopneumonia (14%), non-suppurative pleuritis (6%), non-suppurative bronchitis (6%), hemorrhages and edema (30%), nine of these cases also were positive to bacterial isolation. Thirty-two positive cases corresponded to lungs with no macroscopic lesions, but with histopathology changes compatible with interstitial pneumonia (24%), suppurative pleuropneumonia (4%), suppurative pleurobronchopneumonia (14%), bronchitis (2%), hemorrhages and edema (20%). Bacterial isolation was positive from two of these lungs. The State of Mexico was the state with the most positive cases by IHQ, with 31. From these, 15 were associated with pneumonic lungs and 16 with no lesions. Queretaro was the state with the most positive cases from the pneumonic group, with 19 (Table 2).

Statistical analysis. Results from bacterial isolation and IHQ had a significant difference ($P < 0.001$). The contingency table results using a confidence interval for two proportions with 95% of confidence are as follows: total Chi-square = 83.55 ($P < 0.001$), statistic $g = 91.55$, contingency coefficient = 0.543 and the continuity correction for Chi-square = 80.967 ($P < 0.001$).

Discussion

In the present study IHQ identified the presence of *A. pleuropneumoniae* in 75% of the samples, whereas bacterial isolation detected the microorganism in only 11% of the cases. These results do not agree with the information previously published by Ibarra *et al.*¹⁴, Ohishi *et al.*¹⁵, and Gutiérrez *et al.*¹⁶, who reported 100% and 95% of positive identification for IHQ and bacterial isolation, respectively. However, those experiments were conducted in experimentally infected pigs, whereas results from this study were obtained from clinically healthy animals that had probably acquired the microorganism under natural conditions.

The bacterial identification rate in the macroscopic pneumonic lesion group was higher (86%) than in the non-lesion group (64%), however, the number of animals harboring the microorganism in both groups was high, suggesting a subclinically infected status of these herds. Histopathological analysis evidenced that only 6% of the samples had lesions compatible with PCP which differs from previous studies which had reported the lesions associated with experimental infections. The difference could be attributed to the fact that naturally infected pigs develop chronic lung lesions associated with mixed pathogen infections changing the characteristic lesion pattern of PCP.

It is interesting to point out that although 15 out of 24 lungs from Sonora were classified as positive by IHQ, most of the lungs from this state had no lesions and bacterial isolation was negative in all the samples. These results may be due to the fact that Sonora swine farms are technified and carry out different sanitary practices such as antibiotic treatment at weaning time, which reduces, but not eradicates,

the presence of bacteria, as well as eradication programs against diseases such as Aujeszky, which plays a predisposing role in the clinical presentation of PCP.

A. pleuropneumoniae is not a normal inhabitant of the porcine respiratory tract, but is a consistent pathogen capable of causing clinical disease and fatal infections in previously unstressed animals. The microorganism is present in the tissues of sick animals or pigs that have recovered from the infection. The fact that 75% of the sample animals were positive to *A. pleuropneumoniae* suggests the presence of a high number of healthy carriers, supporting the idea that most swine herds worldwide are endemically infected with *A. pleuropneumoniae*, and that only a very small fraction contain pigs with clinically apparent disease.¹⁷

Control and prevention of PCP require, in most cases, the complete identification of the microorganism. Although the traditional way of demonstrating the presence of *A. pleuropneumoniae* is bacterial isolation and serotyping, these procedures are time consuming and are not very sensitive. Results from this study demonstrated that IHQ had a significantly higher rate of identification than isolation in naturally infected pigs. All these observations serve as grounds to recommend the use of IHQ as a good alternative in the routine diagnosis of PCP.

Referencias

1. Nicolet J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Leman AD, Straw B, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ, editors, Diseases of swine. Ames (Io): Iowa State University Press, 1992:401-408.
2. Blackall PJ, Klaasen HL, Van Den Bosch H, Kuhnert P, Frey J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol* 2002;84:47-52.
3. Bosse JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Simon Kroll J, Langford PR. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.* 2002;4:225-35.
4. Dom P, Haesebrouck FF. Comparative virulence of NAD-dependent and NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *J Vet Med B* 1992;39:303-306.
5. Macinnes JI, Smart NL. *Actinobacillus* and *Haemophilus*. In: Gyles CL, Thoen CV, editors. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Ames (Io): Iowa State University Press, 1993:188-200.
6. Dider PJ, Perino L, Urbance J. Porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*: microbiology and pathologic finding. *J Am Vet Med Assoc* 1984;184:716-719.
7. Chiers K, Haesebrouck F, Van Overbeke I, Charlier G, Ducatelle R. Early *in vivo* interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with tonsils of pigs. *Vet Microbiol* 1999;68:301-306.
8. Gutiérrez CB, Tascon RI, García FJ, Vázquez JA, RodríguezFerri E F. Diagnóstico de la pleuropneumonía porcina. *Med Vet* 1991;8:3-22.
9. Haesebrouck F, Chiers K, Van Overbeke I, Ducatelle R. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiol* 1997;58:239-249.
10. Yolken RH, Leister FJ, Whitcomb LS, Santoshaw M. Enzyme immunoassay for the detection of bacterial antigens utilizing biotin-labeled and peroxidase biotin-avidin complex. *J Immunol Meth* 1983;56:319-327.
11. Ajito T, Haga Y, Homma S, Goryo M, Okada K. Immunohistological evaluation on respiratory lesions of pigs intranasally inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *J Vet Med Sci* 1996;58:297-303.
12. Takashima H, Sakai H, Yanai T, Masegi T. Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, 2, 5 and 7 using the immunohistochemical staining. *J Vet Med Sci* 1999;61:713-716.
13. Sidibe M, Messier S, Lariviere S, Gottschalk M, Mittal KR. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. *Can J Vet Res* 1993;57(3):204-208.
14. Ibargoyen GS, Perfumo CJ, Massone AR, Martín AA, Gimeno EJ. The use of immunoperoxidase techniques for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in tissue sections. *Isr J Vet Med* 1989;45:18-22.
15. Ohishi K, Koeda T, Susuki S, Muramatsu M. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen by immunoperoxidase staining in pulmonary lesions of pigs inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Ann Rep Natl Vet Assay Lab* 1986;24:21-26.
16. Gutiérrez CB, RodríguezBarbosa JI, Suárez J, Tascón RI, Rodríguez Ferri EF. Evaluation of an immunoperoxidase technique using and only Biotin-labeled antibody for the demonstration of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in tissue sections. *J Vet Med B* 1993;40:81-86.
17. Fenwick B, Henry S. Porcine pleuropneumonia. *J Am Vet Med Assoc* 1994;204:1334-1340.

Cuadro 1

FRECUENCIA DE LESIONES HISTOLÓGICAS ASOCIADAS A LA IDENTIFICACIÓN DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* MEDIANTE AISLAMIENTO BACTERIANO E INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) EN PULMONES DE CERDOS RECOLECTADOS EN EL RASTRO

FREQUENCY OF HISTOLOGICAL LESIONS RELATED TO POSITIVE *Actinobacillus pleuropneumoniae* IDENTIFICATION BY BACTERIAL ISOLATION AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHQ) FROM PIG LUNGS COLLECTED AT A SLAUGHTERHOUSE

Histological lesion	Lungs with gross lesions	Positive isolation	Positive IHQ	Lungs with no gross lesions	Positive isolation	Positive IHQ
Bronchopneumonia	21	6/21	16/21	9	1/9	9/9
Interstitial pneumonia	6	0/6	6/6	14	0/14	12/15
Pleuritis	3	0/3	3/3	2	0/2	0/2
Bronchitis	3	0/3	3/3	2	0/2	1/2
Haemorrhages or oedema	17	3/17	15/17	23	1/23	10/22
Total	50	9/50	43/50	50	2/50	32/50

Cuadro 2

IDENTIFICACIÓN DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* MEDIANTE AISLAMIENTO BACTERIANO E INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) EN PULMONES DE CERDOS RECOLECTADOS EN EL RASTRO
IDENTIFICATION OF *Actinobacillus pleuropneumoniae* FROM PIG LUNGS COLLECTED AT THE SLAUGHTERHOUSE, BACTERIOLOGICAL ISOLATION AND IMMUNOHISTOCHEMICAL (IHQ) RESULTS

State	Lungs with gross lesions	Positive isolation	Positive IHQ	Lungs with no gross lesions	Positive isolation	Positive IHQ
Queretaro	21	1	19	4	0	2
Jalisco	8	1	8	0	0	0
State of Mexico	19	7	15	24	2	16
Sonora	2	0	1	22	0	14
TOTAL	50	9	43	50	2	32

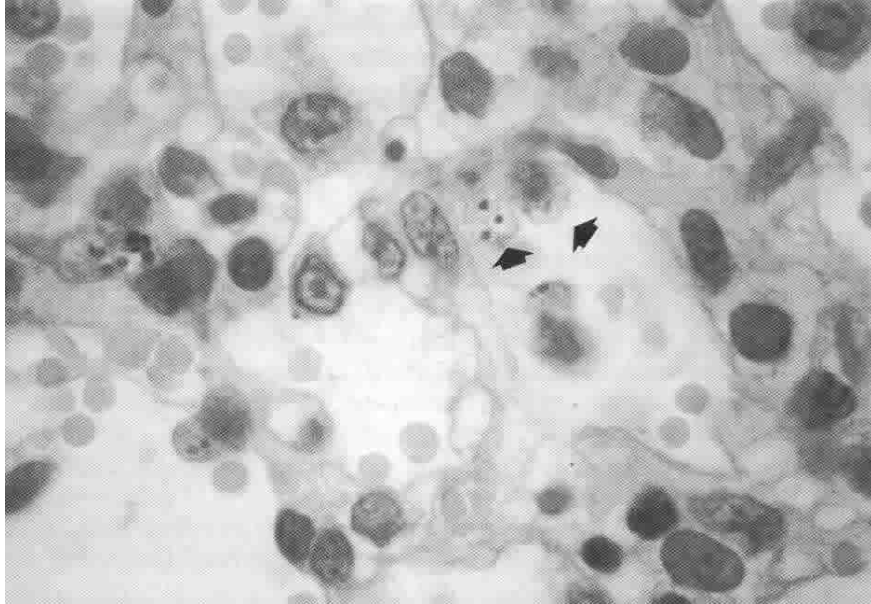


Figura 1. Inmunohistoquímica de un corte de tejido pulmonar mostrando la presencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el citoplasma de macrófagos alveolares (flechas), 600X.

Immunohistochemical staining of a pig lung tissue sample showing a positive reaction against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the cytoplasm of alveolar macrophages (arrows) 600X.