

Perfil serológico del virus de influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en granjas de Yucatán, México

Serological profile of porcine influenza virus, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*, in farms of Yucatan, Mexico

Mario Álvarez Fleites*
Jorge C. Rodríguez Buenfil*
Abel Ciprián Carrasco**
Lourdes Rodríguez Guzmán***
Guadalupe Ayora Tavera†
José C. Segura Correa*

Abstract

The objectives of this study were: to estimate the frequency of pigs that were seropositive to porcine influenza virus (PIV), *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* for each phase of production; as well as to determine the frequency of the most common serotypes of *A. pleuropneumoniae* and subtypes of PIV in fattening pigs. A cross-sectional study was carried out in 25 complete-cycle farms in the state of Yucatan, Mexico. The number of pigs sampled per farm was 40, ten pigs for each phase of production. Blood samples were collected to detect antibodies against PIV subtypes H1N1 and H3N2, *M. hyopneumoniae* and *A. pleuropneumoniae*. Data were analyzed using descriptive statistics and Chi-square tests. The frequency of farms positive to PIV was 56%, with 8.3% and 65.1% pigs seropositive to subtypes H1N1 and H3N2, respectively. The frequency of farms seropositive to *M. hyopneumoniae* was 100% and the individual frequency 29.7%. The frequency of seropositive farms to *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was 100%. Forty-eight percent of the farms were positive to serotype 3, and 52% to serotype 7. Individual frequencies for serotypes 1, 3 and 7 were 11.5%, 7.4% and 10.1%, respectively. In conclusion, there was a high seroprevalence of PIV, *M. hyopneumoniae* and *A. pleuropneumoniae* in farms and pigs of the state of Yucatan. These infectious agents are distributed in the different phases of production of fattening pigs. The H3N2 and H1N1 subtypes of PIV and the serotypes 1, 3 and 7 of *A. pleuropneumoniae* were the most frequent.

Key words: PORCINE INFLUENZA VIRUS, *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*, *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*, PIGS.

Resumen

Los objetivos de este estudio fueron estimar la frecuencia de cerdos seropositivos al virus de influenza porcina (VIP), *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, por etapa de producción; determinar la frecuencia de los serotipos más comunes de *A. pleuropneumoniae* y los subtipos del VIP en cerdos de engorda. Se realizó un estudio sección-cruzada en 25 granjas porcinas de ciclo completo en Yucatán, México. El número de cerdos muestreados por granja fue de 40 animales, divididos en diez cerdos por cada etapa de producción. Muestras de sangre de los cerdos se obtuvieron para detectar presencia de anticuerpos contra el VIP, subtipos H1N1 y H3N2, *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae*. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva y pruebas de Ji-cuadrada. La frecuencia de granjas positivas al VIP fue 56%, con 8.3% y 65.1% de los sueros positivos a los subtipos H1N1 y H3N2,

Recibido el 26 de noviembre de 2003 y aceptado el 22 mayo de 2004.

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Apartado postal 4-116, Mérida, Yucatán, México. E mail: scorrea@tunku.uady.mx

**Coordinación General de Estudios de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores-Cuatitlán, Campo 1, Av. 1 de mayo s/n, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 222, Cuatitlán Izcalli, 54700, Estado de México, México.

***Departamento de Epidemiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, km 15.5, Carretera Mérida-Xmatkuil, 97100, Mérida, Yucatán.

†Centro de Investigaciones Regional "Dr. Hideyo Noguchi", UADY, Ave. Itzaes 490 x 59, C.P. 97000, Mérida, Yucatán, México.

respectivamente. La frecuencia de granjas seropositivas a *M. hyopneumoniae* fue 100% y la frecuencia individual 29.7%. La frecuencia de granjas seropositivas a *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 fue 100%. Cuarenta y ocho por ciento de las granjas fueron seropositivas al serotipo 3 y 52% al serotipo 7. Las frecuencias individuales para los serotipos 1, 3 y 7 fueron 11.5%, 7.4% y 10.1%, respectivamente. Existe alta seroprevalencia de granjas y cerdos con VIP, *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae* en Yucatán. Estos agentes se encuentran distribuidos en las diferentes etapas del periodo de engorda. Los subtipos H3N2 y H1N1 del VIP y los serotipos 1, 3 y 7 de *A. pleuropneumoniae* fueron más frecuentes.

Palabras clave: VIRUS DE INFLUENZA, *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*, *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*, CERDOS.

Introduction

Swine industry in Mexico, as well as that of other countries, is affected by sanitary problems, and among these are the ones that belong to the porcine respiratory complex (PRC). The presence of this complex in farms has an effect on the productive parameters, causing a reduction in growth rate, daily weight gain, feed consumption and conversion and market weight of pigs.¹ Estrada² and Hill *et al.*^{3,4} reported that the daily weight gain of pigs affected with respiratory problems is reduced by 41.1 g and that they delay 16.7 days more to be ready for market, due to which the cost of feed increases by \$79.8 per pig. Different etiological agents participate in the PRC: porcine influenza virus, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The animals that recuperate from PRC remain as carriers of these agents, and they are the main disseminators of the problem when they are introduced into herds that are free from the disease complex. In Yucatan, studies done with PRC are scarce and most of them have been performed in slaughterhouses.⁵

The objectives of this study were to estimate the frequency of pigs seropositive to porcine influenza virus, *M. hyopneumoniae* and *A. pleuropneumoniae* at each production stage; determine the frequency of the most common serotypes of *A. pleuropneumoniae* and the subtypes of porcine influenza virus that are more common in fattening pigs, in intensive production farms of Yucatan, Mexico

Material and methods

The study was carried out in the central zone of Yucatan, Mexico, where the climate is warm subhumid, with summer rains (Aw1). The average annual temperature is 27°C (range from 7 to 42° C), with an annual precipitation mean of 984.4 mm and relative humidity of 78.2%.⁶

A cross-section epidemiological study was done in 25 complete-cycle porcine farms, at one site, where weaning was performed on average at 21 days of age. From weeks four to ten, the piglets were maintained in elevated cage pens, with a capacity for 16 animals

Introducción

En México, como en otros países, la industria porcina se ve afectada por problemas de origen sanitario, entre éstos el complejo respiratorio porcino (CRP). La presencia de este complejo en las granjas tiene efecto en los indicadores de producción, ocasionando disminución en la tasa de crecimiento, en la ganancia diaria, en la conversión alimentaria y en el consumo y peso de los cerdos al mercado.¹ Estrada² y Hill *et al.*^{3,4} notifican que cerdos afectados con problemas respiratorios presentan una disminución en la ganancia de peso de 41.1 g diarios y tardan 16.7 días más en salir al mercado, aumentando esto último el costo por alimento en 79.8 pesos por cerdo. En el CRP intervienen diferentes agentes etiológicos: Virus de influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Los animales que logran recuperarse de CRP quedan portadores de esos agentes, siendo éstos los principales diseminadores del problema cuando son introducidos en hatos libres de la enfermedad. En Yucatán los trabajos realizados sobre CRP son escasos y los existentes, en su mayoría, han sido realizados a nivel de rastro.⁵

Los objetivos de este estudio fueron estimar la frecuencia de cerdos seropositivos al virus de influenza porcina, *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae* por etapa de producción; determinar la frecuencia de los serotipos más comunes de *A. pleuropneumoniae* y los subtipos del virus de influenza porcina más comunes en cerdos de engorda, en granjas de producción intensiva de Yucatán, México

Material y métodos

El estudio se realizó en la zona centro de Yucatán, México, donde el clima es cálido subhúmedo, con lluvias en verano (Aw1). La temperatura media anual es 27°C (rango 7 a 42°C), con precipitación media anual de 984.4 mm y humedad relativa de 78.2%.⁶

Se realizó un estudio epidemiológico transversal en 25 granjas porcinas de ciclo completo, de un solo sitio, cuyo destete se realizaba en promedio a los 21 días de edad. De las semanas cuatro a diez los lechones se mantenían en jaulas elevadas, con

per cage. From weeks 11 to 24 of age, they were maintained in the fattening and finishing pens, with cement floor and a capacity for 16 pigs per pen. The pig breeder population varied between 100 and 1 000 sows.

At the farms, biosafety measures were minimum: the cleaning and disinfecting of cages, pens and buildings was partial; personnel had low sanitary level of hygienic measures; there were no serological samplings of replacement animals, nor did they have a quarantine before entering the farm; and no vaccines were applied against the agents that are studied here. During the research period, the presence of the porcine respiratory complex was reported in the farms (PRC). Different antibiotics and doses were used in the production stages as prophylactic measures against the respiratory problems, based on the criteria and experiences of the veterinary doctors or the producers.

The 25 farms were selected for convenience and acceptance by the producers. The number of sampled pigs per farm was 40 divided in ten pigs for each production stage: weaning, growth, fattening, finishing. The size of the sample was the one that was estimated necessary to detect the presence of antibodies against Aujeszky's disease.⁷ Briefly, an average population of two thousand fattening pigs was considered in the farms that were studied, 95% level of confidence of detecting at least one positive animal in one farm and expected prevalence of 8% and 25% per farm and production stage, respectively.⁸ Within each farm, ten pens were randomly selected per production stage, and one pig per pen.

The blood samples were taken from the anterior venae cava by venopuncture using 7 ml vacutainers (without anticoagulant) and needles number 21.5. The blood was allowed to clot at room temperature and the serum was placed in vials at -20° C until they were used to detect the presence of antibodies against the porcine influenza virus (PIV) subtypes H1N1 and H3N2, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

In order to detect the presence of antibodies against PIV, the hemoagglutination inhibition test was used.⁹ The viral antigens used were A/sw/England/163266/87 (H3N2) and A/sw/Ia/73 (H1N1), that were multiplied in nine to 11 day-old chick embryo allantois. The samples that showed titres of 1:80 or more were considered to be positive.¹⁰ The sensitivity and specificity of the test were 96% in both cases.¹¹

For the detection of antibodies against *M. hyopneumoniae* in serum, the commercial diagnostic test CHEKIT-Hyoptest II was used, which represents an indirect ELISA test. The serum were considered to be: negative (< 20%), suspect (20%-30%) and posi-

capacidad para 16 animales por jaula. De las semanas 11 a 24 de edad se mantenían en el área de engorda y finalizado en corrales con piso de cemento con capacidad para 16 cerdos por corral. La población de cerdos reproductores por granja variaba de 100 a 1 000 vientres.

En las granjas la bioseguridad era mínima: La limpieza y desinfección de jaulas y edificios era parcial; las medidas de higiene del personal eran de bajo nivel sanitario, no se realizaban muestreos serológicos a los animales de remplazo ni se les ponía en cuarentena antes de su ingreso a la granja; tampoco se vacunaba contra ninguno de los agentes aquí estudiados. Durante el periodo de investigación, en las granjas se notificó la presencia del complejo respiratorio porcino (CRP). Diferentes dosis y antibióticos se utilizaron en las etapas de producción, como medidas profilácticas, contra los problemas respiratorios, basados en los criterios y experiencias de los médicos veterinarios o de los productores.

Las 25 granjas se seleccionaron por conveniencia y por disponibilidad de los productores. El número de cerdos muestreados por granja fue 40 animales divididos en diez cerdos por cada etapa de producción: Destete, crecimiento, desarrollo y finalización. El tamaño de muestra calculado fue el necesario para detectar presencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky.⁷ Brevemente se consideró un promedio de población de dos mil cerdos de engorda en las granjas estudiadas, nivel de confianza del 95% de detectar al menos un animal positivo en una granja, y prevalencias esperadas de 8% y 25% para granja y etapa de producción, respectivamente.⁸ Dentro de cada granja se seleccionaron al azar diez corrales por etapa de producción y un cerdo por corral.

Las muestras de sangre de los cerdos se obtuvieron de la vena cava anterior por venopunción utilizando vacutainers (sin anticoagulante) de 7 ml y agujas número 21.5. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y el suero se guardó en viales a -20° C hasta su utilización para detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de influenza porcina (VIP) subtipos H1N1 y H3N2, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Para detectar la presencia de anticuerpos contra el VIP se utilizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación.⁹ Los antígenos virales utilizados fueron A/sw/England/163266/87 (H3N2) y A/sw/Ia/73(H1N1), que se multiplicaron en alantoides de embrión de pollo de nueve a 11 días de edad. Se consideraron muestras positivas que presentaron títulos de 1:80 o más.¹⁰ La sensibilidad y especificidad de la prueba fueron: 96% y 96%.¹¹

Cuadro 1

FRECUENCIA DE CERDOS SEROPositIVOS AL VIRUS DE INFLUENZA PORCINA SUBTIPOS H1N1 Y H3N2 POR ETAPA DE PRODUCCIÓN EN 25 GRANJAS PORCINAS EN YUCATÁN, MÉXICO

FREQUENCY OF PIGS SEROPosITIVE TO THE PORCINE INFLUENZA VIRUS, SUBTIYPES H1N1 AND H3N2 BY PRODUCTION STAGE IN 25 PIG FARMS IN YUCATAN, MEXICO

Stage	Number of pigs	H1N1		H3N2	
		Positive	%	Positive	%
Weaning	250	22	8.8 ^a	156	62.4 ^a
Growth	250	24	9.6 ^a	140	56.0 ^a
Fattening	250	16	6.6 ^a	169	67.6 ^{ab}
Finishing	250	21	8.4 ^a	186	74.4 ^b
Total	1000	83	8.3	651	65.1

^{a,b} Different letters in the same column indicate statistical differences $P < 0.05$

tive (> 30%). The samples with suspect results were analyzed on a second occasion to determine the final interpretation. The specificity of the ELISA test was 99.4% and the sensitivity was 66.7%.

The PLEUROTTEST,¹² diagnostic test was used to detect the presence of antibodies against *A. pleuropneumoniae*; it is a direct plate agglutination test. The sensitivity and specificity of the test were 86% and 97%, respectively.¹³

The data were analyzed by descriptive statistics and Chi-square tests.¹⁴

Results

Porcine influenza

The frequency of farms positive to PIV was 56%, while 8.3% and 65.1% of the sera resulted positive to subtypes H1N1 and H3N2, respectively (Table 1). The highest frequency of seropositive animals to PIV subtype H1N1 was observed in the stages of weaning and growth, even though the differences between stages were not significant ($P < 0.05$). The highest frequency (74.4%) for the subtype H3N2, was observed in the finishing stage ($P < 0.05$). A total of 6.6% (66/1 000) of the sera shared both subtypes of PIV.

Mycoplasma pneumonia

The frequency of seropositive farms to *M. hyopneumoniae* was 100%, since in all of them at least one positive animal was found, and the individual frequency was 29.7% (297/1 000). Statistically significant differences were observed ($P < 0.05$) by production stages, finding the highest number of seropositive animals to *M. hyopneumoniae* in the finishing stage of the pigs. (Table 2).

Para la detección de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* en suero se utilizó la prueba diagnóstica comercial CHEKIT-Hyoptest II, que representa una prueba de ELISA indirecta. La valoración de los sueros se realizó como: negativos (< 20%), sospechosos (20%-30%) y positivos (> 30%). Las muestras con resultados sospechosos fueron analizadas en una segunda ocasión para determinar su interpretación final. La especificidad de la prueba de ELISA fue de 99.4% y la sensibilidad de 66.7%.

Para detectar la presencia de anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae* se utilizó la prueba diagnóstica PLEUROTTEST,¹² que es una prueba de aglutinación directa en placa. La sensibilidad y especificidad de la prueba fueron 86% y 97%, respectivamente.¹³

Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva y pruebas de Ji-cuadrada.¹⁴

Resultados

Influenza porcina

La frecuencia de granjas positivas a VIP fue 56%, mientras que 8.3% y 65.1% de los sueros resultaron positivos a los subtipos H1N1 y H3N2, respectivamente (Cuadro 1). Por etapa de producción, la frecuencia más alta de animales seropositivos al VIP subtipo H1N1 se observó en las etapas de destete y crecimiento, aunque las diferencias entre etapas no fueron significativas ($P < 0.05$). Para el subtipo H3N2, la mayor frecuencia (74.4%) se observó en la etapa de finalizado ($P < 0.05$). El 6.6% (66/1 000) de los sueros compartieron los dos subtipos del VIP.

Neumonía micoplasmática

La frecuencia de granjas seropositivas a *M.*

Cuadro 2
FRECUENCIA DE CERDOS CON ANTICUERPOS CONTRA *Mycoplasma hyopneumoniae* EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE PRODUCCIÓN EN 25 GRANJAS DEL ESTADO DE YUCATAN, MÉXICO

FREQUENCY OF PIGS WITH ANTIBODIES AGAINST *Mycoplasma hyopneumoniae* IN THE DIFFERENT PRODUCTION STAGES IN 25 FARMS OF THE STATE OF YUCATAN, MEXICO

<i>Stage</i>	<i>Number of pigs</i>	<i>Positive</i>	<i>%</i>
Weaning	250	27	10.8 ^a
Growth	250	42	18.8 ^b
Fattening	250	71	28.4 ^c
Finishing	250	157	62.8 ^d
Total	1000	297	29.7

^{a,b,c,d} Different letters in the same column indicate statistical differences ($P < 0.05$).

Porcine contagious pleuropneumonia

The frequency of farms seropositive to *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was 100%. Twelve farms were seropositive to serotype 3 (48%) and 13 (52%) to serotype 7. The individual frequencies for serotype 1, 3 and 7 were 11.5%, 7.4% and 10.1%, respectively (Table 3). Serotypes 1 and 7 were the most frequent ones in the fattening and finishing stages as compared with the weaning and growth stages (Table 3). Serotype 3 was detected in 8.6% of the sera from the weaning stage, 7.4% during growth, 4.6% during fattening and 8.6% during the finishing stage (Table 3). Of the total sera positive to serotype 1, 20 also showed antibodies against serotype 3 and 34 against serotype 7.

Discussion

Porcine influenza

In Mexico, this is the first study on the distribution pattern of seropositivity for PIV subtypes H1N1 and H3N2, in commercial farms. The results of this study indicated a high frequency (56%), as is described in European countries.^{15,16} This indicates that PIV has an ample distribution in pig farms around the world.

Subtype H3N2 showed a higher frequency than subtype H1N1 among the different production stages. In Canada and the United States of America,¹⁷ subtype H3N2 has been reported as an important pathogen of pigs. The importance of this subtype as the primary agent involved in acute and subclinical forms of respiratory diseases has been shown by other authors.^{15,17,18} In epizootiological outbreaks, this subtype causes as clinical signs, abortions in a large number of sows.

The low frequency of seropositivity of the subtype H1N1 indicates that this subtype does not represent an important risk for pigs in this region. Nevertheless, it has been mentioned that there is antigenicity varia-

hyopneumoniae fue 100%, pues en todas se encontró al menos un animal positivo, y la frecuencia individual fue 29.7% (297/1 000). Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) por etapa de producción, encontrándose el mayor número de animales seropositivos a *M. hyopneumoniae* en la etapa de finalizado de los cerdos (Cuadro 2).

Pleuroneumonía contagiosa porcina

La frecuencia de granjas seropositivas a *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 fue 100%. Doce granjas fueron seropositivas al serotipo 3 (48%) y 13 (52%) fueron seropositivas al serotipo 7. Las frecuencias individuales para los serotipos 1, 3 y 7 fueron 11.5%, 7.4% y 10.1%, respectivamente (Cuadro 3). Los serotipos 1 y 7 fueron los más frecuentes en las etapas de engorda y finalizado en comparación con las etapas de destete y crecimiento (Cuadro 3). El serotipo 3 se detectó en 8.6% de los sueros de la etapa de destete, 7.4% en crecimiento, 4.6% en engorda y 8.6% en la etapa de finalizado (Cuadro 3). Del total de sueros positivos al serotipo 1, 20 presentaron además anticuerpos contra el serotipo 3 y 34 contra el serotipo 7.

Discusión

Influenza porcina

En México este es el primer estudio del patrón de distribución de seropositivity contra el VIP, subtipos H1N1 y H3N2, en granjas comerciales. Los resultados de este estudio indican una frecuencia alta (56%), como la descrita en países de Europa,^{15,16} lo que indica que el VIP tiene amplia distribución en las granjas porcinas del mundo.

El subtipo H3N2 mostró mayor frecuencia que el subtipo H1N1 en las distintas etapas de producción.

Cuadro 3
FRECUENCIA DE CERDOS CON ANTICUERPOS CONTRA *Actinobacillus pleuroneumoniae*
SEROTIPOS 1, 3 Y 7 POR ETAPA DE PRODUCCIÓN

FREQUENCY OF PIGS WITH ANTIBODIES AGAINST *Actinobacillus pleuroneumoniae*
 SEROTYPES 1, 3 AND 7 BY PRODUCTION STAGE

<i>Stages</i>	<i>Number of pigs</i>	<i>Serotype 1</i>	<i>Serotype 3</i>	<i>Serotype 7</i>
Weaning	250	3.6 ^a	8.6 ^b	2.8 ^a
Growth	250	2.8 ^a	7.4 ^{ab}	5.9 ^a
Fattening	250	10.4 ^b	4.6 ^a	11.3 ^b
Finishing	250	29.2 ^c	8.6 ^b	19.7 ^c
Total	1 000	11.5	7.4	10.1

^{a,b,c} Different letters in the same column indicate statistical differences $P < 0.05$

tion between the laboratory strains that are used as antigens and the field strains.¹⁷ The fact that 6.6% of the animals were seropositive for both subtypes represents a risk of exchange of genetic material, since the simultaneous infection of a cell with two different PIV could initiate the exchange of genome segments, originating a subtype with genetic rearrangement.¹⁹

In a study done in Mexico, with finished pigs that arrived at the slaughterhouse, from which samples were taken to detect the presence of PIV, subtype H1N1, 20.3% seropositivity was found.¹⁰ It is still not known what participation PIV has in Mexico as primary or secondary agent of the porcine respiratory complex; nevertheless, in other countries it has been documented.¹⁵ Tsai *et al.*,²⁰ in finished animals, found that the incidence of antibodies to PIV, subtypes H1N1 and H3N2, was 21.7% and 20.8%, respectively; observing two increments for subtype H1N1 during the study. The first increment was 35% and the second reached 65% seropositivity. Also, for subtype H3N2 only one increment was observed and it reached 83% of seropositivity.

In the weaning stage 62% of pigs were seropositive to subtype H3N2, this is attributed to antibodies of maternal origin, which diminished during the growth stage. After that, there was seroconversion in the development and finishing stages, situation that is interpreted as a response of the animals to contact with field PIV. This coincides with the practice of moving and mixing animals, which in turn originates the contact between susceptible and infected animals, favoring the dissemination of the agent in the population. The infection with PIV in young pigs suggests that these may remain infected subclinically. This agrees with the results of works done in pig farms in the finishing stage, where high seroprevalences without clinical signs are reported.^{21,22}

En Canadá y Estados Unidos de América se notifica¹⁷ el subtipo H3N2 como un patógeno importante del cerdo. La importancia de este subtipo como agente primario involucrado en enfermedades respiratorias de curso agudo y de formas subclínicas ha sido demostrado por otros autores.^{15,17,18} En brotes epizootiológicos este subtipo presenta como signos clínicos la presencia de abortos en gran número de marranas.

La baja frecuencia de seropositividad del subtipo H1N1 indica que este subtipo no representa riesgo importante para los cerdos en la región. Sin embargo, se menciona que existe variación de antigenicidad entre las cepas del laboratorio que se utilizan como antígenos y las de campo.¹⁷ El 6.6% de animales seropositivos para ambos subtipos representa un riesgo de intercambio de material genético, ya que la infección simultánea de una célula con dos diferentes VIP podría iniciar el intercambio de segmentos del genoma, originando un subtipo con reacomodo genético.¹⁹

En un estudio en México con cerdos finalizados que llegaban al rastro y a los cuales se les tomó muestras para detectar la presencia del VIP, subtipo H1N1, se encontró seropositividad de 20.3%.¹⁰ Todavía no se conoce la participación que tiene el VIP en México como agente primario o secundario en el complejo respiratorio porcino; sin embargo, en otros países su participación está documentada.¹⁵ Tsai *et al.*,²⁰ en animales finalizados, encontraron que la incidencia de anticuerpos al VIP, subtipos H1N1 y H3N2, fue 21.7% y 20.8%, respectivamente; observándose dos incrementos para el subtipo H1N1 durante el estudio. El primer incremento fue 35% y el segundo alcanzó 65% de seropositividad. Asimismo, para el subtipo H3N2 se observó un solo incremento que alcanzó 83% de seropositividad.

Mycoplasma pneumoniae

All the farms that were studied were seropositive to *M. hyopneumoniae*, and this shows the ample distribution of this microorganism in finishing farms. This coincides with results from other studies done in Yucatan, 93.3%²³ and those from other parts of the world. In Sweden and Norway²⁴ 62% and 90% of seropositive farms were found. In Germany²⁴ 75% to 100% of the studied farms were positive to *M. hyopneumoniae* without any differences by region or seasonal variation. In Japan the pigs seroconverted to *M. hyopneumoniae* at four months of age in 64.3% of the conventional farms.²⁵ In the same manner, they reported that 79.1% of the pigs in growth and finishing stages were seropositive.

Of the total amount of sera analyzed for this study 29% were positive, detecting the least number of them in the weaning stage, this increased three to five times more in the areas of growth, development and finishing. Andreasen *et al.*,²² looking for the seroconversion patterns of respiratory pathogens in nine pig farms, found seroconversion to *M. hyopneumoniae* in 100% of them in the animals that were found in the growth and finishing units. According to Ganter,²⁴ in Germany, the frequency of seropositive animals per production stage was: 81.2% in fattening, 33% in piglets, 63% in replacement sows and 47% in adult sows.

Thacker²⁶ and Andreasen *et al.*,²² mentioned that the maternal antibodies against *M. hyopneumoniae* start descending at six weeks of age, and therefore the antibodies detected at the weaning stage are considered as maternal in origin. Also, the increment of antibodies in the stages of growth, development and finishing is possibly due to the presence of the infectious agent that is circulating within the population. This indicates that the infected sows or those who are carriers of *M. hyopneumoniae* are the main source of infection for the piglets, and after that there is transmission between piglets in the maternity section.²⁷ Weaning, transfer to fattening and mixing of animals increase the rate of dissemination; this explains in part the frequency of seropositive pigs when they grow older.

It is known that antibodies detected by ELISA are found in the serum samples six to eight weeks postinfection,^{22,26,28} therefore it is probable that in this study, the infection of the pigs happened in the maternity wards and at the time of weaning, when there is a mix of susceptible and infected animals. Nevertheless, it is difficult to determine the exact age at which the animals became infected with *M. hyopneumoniae*, especially under field condi-

El 62% de cerdos seropositivos al subtipo H3N2, obtenido en la etapa de destete, son atribuidos a anticuerpos de origen materno, los cuales disminuyeron en la fase de crecimiento. Posteriormente ocurrió seroconversión en la fase de desarrollo y finalización, la cual se interpreta como respuesta de los animales al entrar en contacto con el VIP de campo. Esto último coincide con la práctica del movimiento y mezclado de animales, lo que origina el contacto entre animales susceptibles e infectados, favoreciendo la diseminación del agente entre la población. La infección con VIP en cerdos jóvenes sugiere que éstos pueden permanecer infectados en forma subclínica. Lo anterior concuerda con resultados de trabajos en granjas de cerdos en etapa de finalización, en los que se notifica seroprevalencias elevadas sin historial clínico.^{21,22}

Neumonía micoplasmática

La totalidad de las granjas estudiadas fueron seropositivas a *M. hyopneumoniae*, lo cual muestra la amplia distribución que tiene este microorganismo en las granjas de engorda. Esto coincide con resultados en Yucatán, 93.3%²³ y otros descritos en el ámbito mundial. En Suecia y Noruega²⁴ se encontró 62% y 90% de granjas seropositivas. En Alemania²⁴ se encontró que de 75% a 100% de las granjas estudiadas fueron positivas a *M. hyopneumoniae* no existiendo diferencias por región o variación estacional. En Japón los cerdos seroconvirtieron a *M. hyopneumoniae* a los cuatro meses de edad en 64.3% de granjas convencionales.²⁵ Asimismo, informan, que 79.1% de los cerdos de la etapa de crecimiento y finalización fueron seropositivos.

El 29% del total de sueros analizados en este estudio fueron positivos, detectándose en la fase de destete el menor número de ellos, el cual incrementó de tres a cinco veces en las fases de crecimiento, desarrollo y finalización. Andreasen *et al.*²² para conocer los patrones de seroconversión a patógenos respiratorios en nueve granjas porcinas, encontraron que la seroconversión contra *M. hyopneumoniae* se dio en 100% de ellas y ocurrió en los animales localizados en las unidades de crecimiento y finalización. Según Ganter,²⁴ en Alemania la frecuencia de animales seropositivos por etapa de producción fue: 81.2% en engorda, 33% en lechones, 63% en marranas de remplazo y 47% en marranas adultas.

Thacker²⁶ y Andreasen *et al.*²² mencionan que los anticuerpos maternos contra *M. hyopneumoniae* comienzan a descender a la semana seis de vida, de aquí que los anticuerpos detectados en la fase de destete sean considerados de origen maternal.

tions. The distribution of *M. hyopneumoniae* suggests that its transmission is very efficient.

Pijoan and Ruiz²⁹ indicated that in animals sampled and tested by PCR in field outbreaks, a large amount of animals may be infected before observing the rapid dissemination of the organism within the farm. This suggests the fact that a minimum load of agent may be present before the rapid transmission. This explains partially, the epidemiological differences observed in the different production systems.

Loeffen *et al.*¹⁵ indicate that *M. hyopneumoniae* is associated with the PRC and that *M. hyopneumoniae* was found in animals long before the clinical semiotics were seen. Also, it is possible that the pigs that present a subclinical infection are much more susceptible to pathogens that cause outbreaks of acute respiratory problems. A combination of environmental factors and the contact with older carrier animals that have had clinical signs of pneumonia, increases the risk of infection and dissemination of the mycoplasmal pneumonia in pigs lodged in the finishing areas.²⁷

Porcine contagious pleuropneumonia

The seroprevalence results in the farms infected with *A. pleuropneumoniae* (100%) indicate that this agent is widely disseminated in the region. In Yucatan 96.9% seropositivity is reported in 33 farms.²³ The highest frequency of serotypes 1 and 7, in comparison with serotype 3, agrees, in part, with the results of other studies done in Yucatan. Huchin³⁰ identified serotypes 1, 4 and 11; Torres³¹ serotypes 1, 3 and 5, and Moguel²³ serotypes 1, 3, 5 and 7.

In Iowa, United States of America, the presence of antibodies against *A. pleuropneumoniae* were reported in 68.8% of 597 farms and 32.1% of 7 348 sera.³² The animal health surveillance system reports that 8.1% of the fattening pig farms and 3.4% of the breeder farms showed problems of porcine contagious pleuropneumonia.³³ This indicates that *A. pleuropneumoniae* is disseminated in the United States, and this is important since it is the main origin of the genetic material that is introduced into Yucatan. In the United States, serotypes 1, 5, and to a lesser degree number 7, are the most prevalent and responsible for 95% of the clinical cases of pleuropneumonia; although it has been observed that the frequency of serotype 3 is increasing.³⁴ Nevertheless, the interpretation of the serology results should be carefully made, since within the *A. pleuropneumoniae* serotypes there are groups that share antigens, originating crossed reactions.³⁵

During the weaning stage, the antibodies against this bacteria that are detected may be interpreted as

Asimismo, el incremento de anticuerpos en la fase de crecimiento, desarrollo y finalización posiblemente se deba a que el agente infeccioso se encuentra circulando en la población. Esto último indica que las marranas infectadas o portadoras de *M. hyopneumoniae* son la principal fuente de infección para los lechones, presentándose luego la transmisión entre lechones en la maternidad.²⁷ El destete, traslado a la engorda y mezclado de animales incrementa la tasa de diseminación; esto explica en parte la frecuencia de cerdos seropositivos al aumentar la edad de los cerdos.

Se conoce que los anticuerpos detectados por ELISA se encuentran en las muestras de suero de seis a ocho semanas posinfección,^{22,26,28} por lo que es muy probable que en este estudio la infección de los cerdos ocurrió en las salas de maternidad y al momento del destete cuando existe mezcla de animales susceptibles e infectados. Sin embargo, es difícil determinar la edad exacta en que los animales se infectan con *M. hyopneumoniae*, sobre todo bajo condiciones de campo. La distribución de *M. hyopneumoniae* sugiere que su transmisión es muy eficiente.

Pijoan y Ruiz²⁹ señalan que en animales muestreados con la prueba de PCR en brotes de campo, gran proporción puede estar infectados antes de que se observe la diseminación rápida del organismo dentro de granja. Esto sugiere que una carga mínima del agente puede estar presente antes de que ocurra la transmisión rápida. Lo anterior explica, en parte, las diferencias epidemiológicas observadas en los variados sistemas de producción.

Loeffen *et al.*¹⁵ señalan que *M. hyopneumoniae* está asociada con la enfermedad CRP y que *M. hyopneumoniae* se encontraba en los animales mucho antes de que se presentara semiótica clínica. Asimismo, es posible que los cerdos que presentan la infección subclínica sean mucho más susceptibles a patógenos que causen brotes de problemas respiratorios agudos. Una combinación de factores ambientales y el contacto con animales portadores de mayor edad, los cuales han presentado signos clínicos de neumonía, incrementa el riesgo de infección y diseminación de la neumonía micoplasmática en cerdos alojados en las áreas de finalización.²⁷

Pleuroneumonía contagiosa porcina

Los resultados de seroprevalencia de granjas infectadas con *A. pleuropneumoniae* (100%) indican que este agente está muy difundido en la región. En Yucatán se notifica 96.9% de seroposividad en 33 granjas.²³ La mayor frecuencia de los serotipos 1 y 7, en comparación con el serotipo 3, coincide, en parte, con los resultados de otros trabajos en Yucatán.

maternal, which diminish until the growth stage. This is in agreement with what has been reported in the literature, that indicates that maternal antibodies begin to disappear at 8 to 12 weeks of age.³⁶ Afterwards an increase of seropositive animals is observed, obtaining a maximum at the finishing stage. This is interpreted as evidence that the animals were in contact with the microorganism. In most of the farms infected endemically, 100% of the breeder herd animals have positive serology.³⁴ The farms infected with *A. pleuropneumoniae* are classified in four categories where the criteria are the presence of clinical signs and the detection of circulating antibodies. Even though in this study the farms were seropositive, it cannot be said that the animals were clinically affected, due to the fact that there are farms that show clinical signs and are serologically positive and others are not. According to some researchers, 80% of the farms have negative semiotics and positive serology.³⁴ This is in agreement with the results obtained in this study, since seropositivity was detected but the characteristic clinical signs of *A. pleuropneumoniae* were not observed.

Serotype 1 represents a high risk to the pig population, since it is classified as being more virulent due to the fact that it produces Apx 1 toxin, that is a potent hemolysine and Apx II, that has a similar function as the first, and is controlled by the same group of genes.^{35,37} Serotype 7 is considered to be less virulent, since it produces seroconversion in a large amount of animals with only a small amount of clinical signs.

On the other hand, the results of this study suggest that the tested sera with the Pleurotest may agglutinate with only one serotype or more than one and the animals could have been in contact with one or several of them. For example, 17.3% of the sera agglutinated with serotype 1 and with serotype 7, 29.5% of the same. The above coincides with what was notified by Torres *et al.*³⁸ in the State of Mexico, Mexico, who found that 69.5% of the sera agglutinated to more than one serotype. In Yucatan, Torres³¹ and Moguel²³ found that 54% and 37.2% of the sera that were positive, agglutinating to more than one serotype of *A. pleuropneumoniae*. In this work, it was found that the fattening and finishing stages had the highest percentages (23.8% and 19.6%, respectively) of animals that reacted with more than one serotype. It is indicated that the more serotypes are circulating in an animal population, the more severe the clinical signs are and its control is more difficult.

In this study, it was concluded that there was a high frequency of farms and pigs with PIV, *M. hyo-*

Huchin³⁰ identificó los serotipos 1, 4 y 11; Torres³¹ los serotipos 1, 3 y 5, y Moguel²³ los serotipos 1, 3, 5 y 7.

En Iowa, Estados Unidos de América, se informó que 68.8% de 597 granjas y 32.1% de 7 348 sueros analizados tuvieron anticuerpos contra *A. pleuropneumoniae*.³² El sistema de vigilancia de salud animal informa que en granjas de cerdos de engorda 8.1% presentaron problemas de pleuroneumonía contagiosa porcina y 3.4% en granjas de pie de cría.³³ Esto indica que *A. pleuropneumoniae* se encuentra difundido en la Unión Americana, siendo importante debido a que es el principal origen del material genético que se introduce a Yucatán. En Estados Unidos los serotipos 1, 5, y en menor grado el 7, son los más prevalentes y responsables de 95% de los casos clínicos de pleuroneumonía, aunque se ha observado que la frecuencia del serotipo 3 está incrementándose.³⁴ Sin embargo, la interpretación de los resultados serológicos debe ser cuidadosa, debido a que dentro de los serotipos de *A. pleuropneumoniae* existen grupos que comparten antígenos, originando reacción cruzada.³⁵

En la fase de destete, los anticuerpos detectados contra esta bacteria se pueden interpretar como de origen maternal; éstos disminuyeron hasta la fase de crecimiento, lo cual concuerda con lo señalado en la literatura, que indica que a las ocho a 12 semanas los anticuerpos maternos comienzan a desaparecer.³⁶ Posteriormente se observa un incremento de animales seropositivos, obteniéndose el máximo en la fase de finalización. Esto se interpreta como evidencia de que los animales estuvieron en contacto con el microorganismo. En la mayoría de las granjas infectadas endémicamente, todos los animales del hato reproductor presentan serología positiva.³⁴ Las granjas infectadas con *A. pleuropneumoniae* se clasifican en cuatro categorías donde los criterios son la presencia de signos clínicos y la detección de anticuerpos circulantes. Aunque en este estudio las granjas fueron seropositivas no se puede decir que los animales estén afectados clínicamente, debido a que existen algunas granjas que presentan signos clínicos y son serológicamente positivas y otras no. Según algunos investigadores, 80% de las granjas se encuentran con semiótica negativa y serología positiva,³⁴ lo que concuerda con el resultado de este estudio; se detectó seropositividad, pero los síntomas clínicos característicos contra *A. pleuropneumoniae* no se observaron.

El serotipo 1 es de mayor riesgo para la población porcina, ya que se clasifica como de mayor virulencia debido a que produce la toxina Apx 1, la cual es una potente hemolisina y la Apx II, que tiene una función similar a la primera, y se encuentra controlada por el mismo grupo de genes.^{35,37} El serotipo 7 se considera

pneumoniae and *A. pleuropneumoniae* in Yucatan and that the infectious agents are distributed in the different stages of the fattening period. The H3N2 and H1N1 subtypes of PIV and the serotypes 1, 3 and 7 of *A. pleuropneumoniae* were the most frequent ones.

Referencias

1. Dee SA. The porcine respiratory disease complex. Are subpopulations important? J Swine Health Prod 1996;4:147-149.
2. Estrada R. Latin America what is the prevalence and economical effect of respiratory disease? Pig Prog 1998;14: 6-8
3. Hill M.A. Schidt A.B., Tecalw F.R., Clark L.K., Knox E.K. Jordan M. Association between growth indicators and volume of lesions in lungs from pigs at slaughter. Am. J. Vet. Res. 1992;53: 2221-2223.
4. Hill M.A. Schidt A.B., Teclaw F.R., Clark L.K., Knox E.K. Jordan M. Relationship between the performance and the weight of pneumonia lesions from pigs at slaughter. Res Vet Sci 1994;56: 240-244.
5. Williams JJ, Torres León MA, Sansor Nah R. Prevalencia, caracterización y extensión de las lesiones en pulmones de cerdos sacrificados en el rastro municipal de Mérida, Yucatán, México. Rev Biomédica 2000;11:25-32.
6. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Anuario estadístico del estado de Yucatán. INEGI, 1997.
7. Rodríguez-Buenfil JC, Alvarez-Fleites M, Alzina-Lopez A, Arjona-Torres MG, Segura-Correa JC, Villegas-Perez S. Risk factors for Aujeszky's disease in pig herds and detection of field virus antibodies in fattening pigs in the state of Yucatan, Mexico. Prev Vet Med 2002;53:205-213.
8. Martin SW, Meek AH, Willenberg P. Veterinary Epidemiology. Ames Iowa, Iowa State University Pres. 1987.
9. Rockborn G, Klingerborn B, Juntti N. Diagnostic virology: Second Part Guidebook to Procedures, Uppsala, Sweden. Editor J. Moreno-Lopez. 1990. pp 39-43.
10. Rodríguez TJ, Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC. Muestreo serológico a nivel de rastro para detectar anticuerpos contra el virus de Influenza Porcina. Vet Méx 1996;27:17-21.
11. Westenbrink F, Veldhuis M A, Brinkhof J M A. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine parvovirus. J Virology Methods 1989;23:169-178
12. Ciprián A, Colmenares G, Mendoza S. La enfermedad de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en México. Compendio de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Guadalajara, Jalisco, Editado por AMVEC. 1990; pp 29-42.
13. Colmenares G, Mendoza S, Ayala G, Ciprian A. A rapid field serological test for the diagnostic of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. Proceeding of the 12th International Pig Veterinary Society Congress. 1992,

menos virulento, aunque produce seroconversión en gran proporción de animales con sólo algunos signos clínicos.

Por otro lado, los resultados de este estudio sugieren que los sueros probados con el Pleurotest pueden aglutinar con un solo serotipo o con más de uno y los animales pudieron estar en contacto con uno o varios de ellos. Por ejemplo, con el serotipo 1 y serotipo 3 aglutinaron 17.3% de los sueros y con el serotipo 1 y 7, 29.5% de los mismos. Lo anterior coincide con lo notificado por Torres *et al.*³⁸ en el Estado de México, México, quienes encontraron que 69.5% de los sueros aglutinaron para más de un serotipo. En Yucatán, Torres³¹ y Moguel²³ encontraron que 54% y 37.2% de los sueros que resultaron positivos, aglutinaron con más de un serotipo de *A. pleuropneumoniae*. En este trabajo se encontró que en las fases de engorda y finalización se encontraron los mayores porcentajes (23.8 y 19.6, respectivamente) de animales que reaccionaron con más de un serotipo. Se señala que mientras más serotipos circulen en una población animal, la presentación clínica de la enfermedad es más severa y su control más difícil.

Se concluye que en este estudio existió una alta frecuencia de granjas y cerdos con el VIP, *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae* en Yucatán y que los agentes infecciosos se encuentran distribuidos en las diferentes etapas del periodo de engorda. Los subtipos H3N2 y H1N1 del VIP y los serotipos 1, 3 y 7 de *A. pleuropneumoniae* fueron los más frecuentes.

July 5-9. The Hague, The Netherlands, IPVS: 1992.

14. EpiInfo (Computer Program). A word processing, database, statistics program for public health for Epidemiology Program Office, Center for Disease Control and Prevention. Version 1.0 for Windows. Atlanta, 2000.
15. Loeffen W. A production balancing act. Pig Prog 2001;17:4-6.
16. Van Reeth K, Guan Y. Swine Influenza: an update from Europe and Asia. Disease, Pig Prog 2000;16 Supl:4-7.
17. Janke HB. Diagnostic of swine influenza. Swine Health Prod 2000;8:79-81.
18. Erickson GA, Swenson SL. H3N2 SIV in the USA. Pig Prog 2000;16Supl:8-9.
19. Brown IH, Alexander DJ, Chakraverty P, Harris PA, Manvell RJ. Isolation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) from pigs in England, and the subsequent experimental transmission from pig to pig. Vet. Microbiol 1994;39:125-134.
20. Tsai CP, Cheng MC, Lin DT, Chen CM. The prevalence of hemoagglutination-inhibition (HI) antibodies to influenza viruses A/swine/Iowa/15/30(H1N1) and A/Swine/Obihiro/10/85 (H3N2) in Taiwan pigs. Proceedings of the 16th International Pig Veterinary

- Society Congress; 2000 September 17-20, Melbourne, Australia. IPVS: 2000.
21. Van Reeth K, Pensaert MB. Porcine respiratory coronavirus mediated interference against influenza virus replication in the respiratory tract of feeder pigs. *Am J Vet Res* 1994;55:1275-1281.
 22. Andreasen M, Nielsen JP, Baekbo P, Willeberg P, Botner A. A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. *Prev Vet Med* 2000;45:221-235.
 23. Moguel JR. Seroprevalencia y descripción de algunas variables relacionadas a la presentación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae* en granjas porcinas de Yucatán (tesis de maestría). Mérida (Yucatán) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, 1997.
 24. Yagihashi T, Kazama JY, Tajima M. Seroepidemiology of mycoplasmal pneumonia of swine in Japan as surveyed by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Microbiol* 1993;34:155-166.
 25. Ganter M. Respiratory disease: Europe. *Pig Prog* 1998;14:12-16.
 26. Thacker LE. Mycoplasma vaccines: what we know, what we don't know. Proceeding of the ISU Veterinary Medicine Seminar on *Mycoplasma Pneumonia* in modern Swine Production Units. 1997 April 22. Ames Iowa, Iowa State University. 1997. pp 11-13.
 27. Clark K, Freeman J, Scheidt A, Knox K. Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. *Vet Med* 1991;16:543-550.
 28. Morris RC, Gardner AI, Hietala KS, Carpenter ET, Anderson JR, Parker MK. Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Prev Vet Med* 1995;21:323-337.
 29. Pijoan C, Ruiz A. Transmission of *M. hyopneumoniae*. *Pig Prog* 2001;17Suppl:14-15.
 30. Huchin AL. Serotipificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por la técnica de coaglutinación en combinación con la técnica de estimación cuantitativa por dilución doble (tesis de licenciatura). Mérida (Yucatán) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, 2000.
 31. Torres M. Prevalencia de lesiones en pulmones y evaluación de una prueba de aglutinación en placa (Pleurotest) para la detección de anticuerpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* en cerdos sacrificados en el rastro municipal de Mérida, Yucatán (tesis de maestría) Mérida (Yucatán) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, 1995 .
 32. Schultz RA, Young TA, Ross DF, Jeske DR. Prevalence of antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* in Iowa swine. *Am J Vet Res* 1982; 43:1848-1851.
 33. United States Department of Agriculture. National animal health monitoring service 2002. Part II reference of swine health and health management in USA. (serial online) Available from: URL: <http://www.Aphis.usda.gov/vs/ceah/cahm/Swine/swinepart2.pdf>.
 34. Marsteller TA, Fenwick B. *Actinobacillus pleuropneumoniae* disease and serology. *Swine Health Prod* 1999;7:161-165.
 35. Gottschalk M. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: an update. Proceeding of the annual meeting of the American Association of Swine Practitioners. 1999, February 27-March 2. Iowa, AASV, 357-361. 1999
 36. Wongnarket S, Pfeiffer DU, Morris RS, Fenwick SG. An on-farm study of the epidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs as part of a vaccine efficacy trial. *Prev Vet Med* 1999;39:1-11.
 37. Taylor JD. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Disease of Swine 8TH edition. Straw, B., A'Allaires, S., Mengeling, and Taylor, D. editors. Ames, Iowa. Iowa State University Press. 1999.
 38. Torres A, Carrión M, Mendoza S, Ciprián A. Estudio serológico con Pleurotest empleando los serotipos 1, 2, 3, 5, 7, 9 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* relacionado con la patología y bacteriología de pulmones colectados en rastro. Memorias del XXVI Congreso Nacional AMVEC; 1991 julio 28-31; Mérida (Yucatán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC, 1991:157-159