

Utilização de um teste de ELISA polivalente para detecção de anticorpos contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App)

(Utilization of a polyvalent ELISA test for detection antibodies against of Actinobacillus pleuropneumoniae)

J.D. Kich¹, I.A. Piffer^{3,5}, A.L. Guidoni³, D.E.S.N. Barcellos^{2, 4}, C.S. Klein³

1URCAMP-Centro de Ciências Rurais

Av. Tupi Silveira, 2099

CEP 96400-110 - Bagé, RS

2Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3EMBRAPA Suínos e Aves - Concórdia, SC

4FFFCMPA, RS.

5Bolsista do CNPq.

Recebido para publicação, após modificação, em 2 de agosto de 1999.

Projeto financiado pelo Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves - CNPSA-EMBRAPA

E-mail: jalu@zipmail.com.br

RESUMO

Um teste de ELISA polivalente baseado em lipopolissacarídeos de cadeia longa (LPS – CL) de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) sorotipos 3, 5 e 7 foi avaliado testando-se amostras do soro de leitões e matrizes provenientes de 10 rebanhos positivos e de 10 rebanhos negativos. Foram classificados como positivos aqueles rebanhos com isolamento prévio do App sorotipos 3, 5 ou 7 e rebanhos negativos aqueles submetidos ao controle veterinário, sem notificação de sintomas clínicos, sem lesões de pleuropneumonia suína e sem isolamento do agente. Todos os rebanhos positivos apresentaram sorologia positiva e as matrizes apresentaram maior número de soroconversores ($P < 0,05$) do que os leitões. Entre os rebanhos negativos quatro apresentaram sorologia negativa, cinco sorologia positiva com valores preditivos altos (96 a 99%) e um com valor preditivo considerado baixo (56%). O teste apresentou 100% de sensibilidade e aparentemente baixa especificidade, porém, como detectou os sorotipos prevalentes no Brasil e sorotipos que possuem LPS – CL homólogos (3, 4, 5, 6, 7 e 8), ele é aplicável somente como teste de triagem.

Palavras-Chave: Suínos, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pleuropneumonia, ELISA

ABSTRACT

Sera from piglets and sows from 10 positive and 10 negative herds to *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) were submitted to a polyvalent ELISA test based on long chain lipopolysaccharides (LC-LPS) against serotypes 3, 5 and 7. Positive herds were those in which a strain of serotype 3, 5 or 7 was isolated and negative those ones in which there were neither notification of clinical symptoms, nor lesions of swine pleuropneumoniae, nor App isolation and all the herds were under veterinary control. All positive herds contained animals that seroconverted and the frequency of sows serologically positive was significantly higher than that of positive piglets. Four negative herds were serologically negative, but five herds had sows considered positive with high positive predictive values (96 to 99%) and one herd had a positive predictive value of 56%. The polyvalent ELISA LC-LPS to App serotypes 3, 5 and 7 had 100 % of sensibility but apparently low specificity. The sensibility of the polyvalent test and its capability of detecting the prevalent Brazilian serotypes and those with shared LPS antigens (3, 4, 5, 6, 7 e 8) indicates that this test might be used only as a screening test.

Keywords: Swine, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pleuropneumonia, ELISA

INTRODUÇÃO

A pleuropneumonia suína (PS) é uma doença infecto-contagiosa causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). A doença caracteriza-se, na fase aguda, por áreas de pneumonia necro-hemorrágicas, associadas a pleurite serofibrinosa e, na fase crônica, por seqüestro do tecido necrosado com formação de nódulos delimitados por cápsula de tecido fibroso e aderências firmes entre serosas adjacentes (Mores et al., 1984). São reconhecidos 12 sorotipos capsulares para o App (biovar 1), sendo que o sorotipo 5 apresenta dois subtipos, 5A e 5B (Nicolet, 1971; Gunnarsson et al., 1977; Kilian et al., 1978; Rosendal & Boyd, 1982; Nielsen & O'Connor, 1983; Nielsen, 1985a, b; Nielsen, 1986a, b). No Brasil, os sorotipos prevalentes são o 3, 5 e 7 (Piffer et al., 1997).

Para o diagnóstico sorológico da PS foram desenvolvidos vários testes: imunodifusão (Nicolet, 1971), aglutinação (Gunnarsson & Biberstein, 1977), fixação de complemento (Gunnarsson, 1979), imunofluorescência (Rosendal et al., 1983), ELISA (Nicolet et al., 1981), soroaglutinação em microtitulação com 2-mercaptoetanol (Mittal et al., 1984), soroaglutinação em microtitulação com 2-mercaptoetanol (Piffer et al., 1985) e inibição de citolisinas (Hutrerá & Pijoan, 1992). Comparando-se esses testes, o ELISA e o de neutralização das citolisinas foram os que apresentaram melhores resultados (Fenwick, 1992). Os testes de ELISA são sorotipo dependentes e, portanto, devem conter os sorotipos prevalentes em uma determinada região, o grande número de sorotipos levou vários autores a instituírem testes polivalentes (Bossé et al., 1992a; Bunka et al., 1992; Fenwick, 1992; Gottschalk et al., 1992). Machado et al. (1997a) padronizaram um ELISA polivalente baseado em uma mistura de antígenos lipopolissacarídeos de cadeias longas (LPS-CL) dos sorotipos de App prevalentes no Brasil (3, 5 e 7) os quais possuem LPS-CL homólogos aos sorotipos 3, 4, 5, 6, 7 e 8. O objetivo deste trabalho foi avaliar em campo o teste desenvolvido por esses autores.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram identificados 10 rebanhos positivos (números de 1 a 10) e 10 negativos (números de 11 a 20) para PS. Foram considerados rebanhos positivos aqueles nos quais já havia sido isolado o App, sem posterior repopulação do rebanho (registros de isolamento de App realizados no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves-EMBRAPA). Nessa categoria também foram enquadrados os rebanhos que sabidamente recebiam animais de granjas onde o agente tinha sido isolado. Foram identificados 10 rebanhos negativos, os quais estavam sob cuidados de um médico veterinário, sem diagnóstico clínico ou suspeita de PS e sem registro de lesões suspeitas ao abate. Os rebanhos negativos representam os núcleos genéticos de algumas empresas do Sul do Brasil, classificados sanitariamente como rebanhos de alta saúde e, de acordo com informação dos responsáveis técnicos, sem vacinação

De cada um dos 20 rebanhos, tanto positivos quanto negativos, foram coletadas amostras de sangue de aproximadamente 100 fêmeas em reprodução e de aproximadamente 100 leitões distribuídos em categorias de idade (9 a 15 semanas). O número exato de animais coletados consta na [Tab. 1](#). Em alguns rebanhos onde não foi possível completar o número de leitões nessa faixa etária, foram amostrados leitões de 8 e 16 semanas. Foram coletadas amostras de sangue de cada animal (8ml), por punção da veia cava anterior, estocadas em refrigeração e dessoradas no dia seguinte. O soro obtido foi estocado a -20°C até o momento de uso.

Tabela 1. Resultados sorológicos de leitões e matrizes de todos os rebanhos, obtidos pelo teste de ELISA baseado em LPS - CL, polivalente para os sorotipos 3, 5 e 7.

Rebanho ¹	Leitões		Matrizes	
	Prevalência	VP+	Prevalência	VP+
1	0,97 ² (1/103) ³	6,60	92,78 (90/97)	99,00
2	24,04 (25/104)	76,85	92,71 (89/96)	99,00
3	1,89 (2/106)	16,80	96,01 (98/102)	99,00
4	28,70 (31/108)	80,00	92,66(101/109)	99,00
5	1,90 (2/105)	16,90	92,01 (93/101)	99,00
6	1,98 (2/101)	17,00	89,79 (88/98)	99,00
7	11,65 (12/103)	58,00	97,00 (97/100)	99,00
8	0,99 (1/101)	9,40	73,53 (75/102)	97,00
9	3,81 (4,105)	29,35	89,90 (89/99)	98,00
10	25,96 (27/104)	79,00	56,19 (59/105)	93,00
11	1,18 (1/85)	11,00	11,00 (11/100)	56,00
12	10,89 (11/101)	56,00	71,72 (71/99)	96,00
13	0,00 (0/105)	0,00	0,00 (0/106)	0,00
14	0,00 (0/102)	0,00	83,50 (81/97)	98,00
15	3,26 (3/92)	19,00	92,16 (94/102)	99,00
16	0,00 (0/98)	0,00	73,74 (73/99)	97,00
17	0,00 (0/99)	0,00	97,98 (97/99)	98,00
18	0,00 (0/105)	0,00	0,00 (0/82)	0,00
19	NE	NE	0,00 (0/98)	0,00
20	0,00 (0/91)	0,00	0,00 (0/105)	0,00

¹Rebanhos de 1 a 10 com isolamento positivo de App para um dos sorotipos componentes do teste

²Prevalência de animais positivos em porcentagem e número de animais positivos sobre o total de animais testados; VP valor preditivo; NE não examinado

As amostras de soro coletadas foram submetidas ao teste polivalente de ELISA para os sorotipos 3, 5 e 7, desenvolvido na EMBRAPA Suínos e Aves (Machado et al. 1997a). De imediato, as microplacas impregnadas com o antígeno, mantidas a -70°C, foram descongeladas à temperatura ambiente, lavadas três vezes com 0,05M PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS/Tween-20) e secadas. Os soros a serem testados e os soros-controle foram diluídos a 1:50 (v/v) em PBS/Tween-20 com 1% de albumina sérica bovina (BSA), adicionados em triplicata aos poços

correspondentes e incubados a 37°C por 30min. Após lavagem e secagem das placas, foram adicionados 100 μ l do conjugado (soro ovino hiperimune contra IgG de suíno, conjugado com peroxidase, produzido no próprio laboratório) e procedida a incubação a 37°C por 30min. A seguir, as placas foram novamente lavadas e secadas e, então, adicionadas de 100 μ l do revelador (2'2-Azino-bis 3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) (Diammonium salt, ABTS-SIGMA) e mantidas por 30min na temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 50 μ l de uma solução 0,5M de ácido cítrico para interromper a reação enzimática. A seguir, procedeu-se a leitura das placas em espectrofotômetro (TITERTEK MULTISKAN MCC) com filtro de 405nm de comprimento de onda. Os resultados foram transferidos para o computador e manipulados dentro do programa KELA, conforme descrito por Jacobson & Downing (1991). Os resultados ajustados foram classificados como soros positivos e negativos de acordo com as equações discriminantes de Anderson (1958) determinadas por Machado et al. (1997b). Animais com resultados sorológicos com probabilidade inferior a 80% foram classificados como suspeitos. Todos esses passos pertencem ao procedimento DISCRIM do SAS (SAS, 1990). Com a classificação dos animais em negativos e positivos, foi calculado o valor preditivo para os resultados positivos dos leitões e matrizes. Esses cálculos foram baseados em Tyller & Cullor (1989), a partir da sensibilidade (91,51%) determinada por Machado et al. (1997a). Para definir qual a categoria animal a ser amostrada, entre leitões e matrizes, a proporção de animais reagentes positivos por rebanho foi comparada por qui-quadrado (SAS, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A [Tab. 1](#) apresenta dados obtidos na sorologia dos 20 rebanhos avaliados, após análise discriminante em que os animais foram classificados como positivos ou negativos quando a probabilidade de pertencerem a qualquer uma dessas populações foi superior a 50%. Os rebanhos de número 1 a 10 foram os considerados positivos e os de 11 a 20 negativos, conforme critérios acima descritos. Observa-se que, com os resultados das matrizes, o teste de ELISA polivalente para os sorotipos 3, 5 e 7 do App baseado em LPS-CL caracterizou os rebanhos cronicamente infectados e com altos valores preditivos. Entre os rebanhos cronicamente infectados, o valor preditivo dos leitões positivos foi inferior a 50% em seis rebanhos. Isso significa, considerando os resultados da sensibilidade observados por Machado et al. (1997a), que nesses rebanhos os animais sorologicamente positivos têm probabilidade menor que 50% de estarem realmente infectados. Isso decorre do fato de que o valor preditivo, além de depender da sensibilidade e especificidade do teste, depende também da prevalência de soroconversores no rebanho. O valor preditivo positivo aumenta de acordo com o aumento da prevalência dos soroconversores ([Tab. 1](#)). Observa-se também que os valores preditivos nas matrizes dos rebanhos positivos são altos, de 93 a 99%. Portanto, o teste aplicado às matrizes demonstrou ser mais confiável do que quando aplicado nos leitões nas idades analisadas. Na comparação por qui-quadrado a proporção de matrizes soroconversoras foi sempre significativamente maior do que a de leitões ($P < 0,01$), em todos os rebanhos com sorologia positiva. Entretanto, os leitões filhos de fêmeas positivas, após beberem o colostro, poderiam ser uma alternativa de amostragem para a realização do diagnóstico. Bossé et al. (1992b) sugeriram, além das matrizes, essa categoria como apropriada para detecção de reagentes positivos.

A classificação dos resultados pela análise discriminante das matrizes, incluindo a categoria de suspeitos, encontra-se na [Tab. 2](#). A classificação quanto ao status do rebanho em relação à infecção por App foi idêntica àquela discriminada na [Tab. 1](#). Apenas houve decréscimo na prevalência dos soroconversores em função da definição de soros suspeitos, que foram aqueles que apresentaram probabilidade entre 50% e 80% de pertencerem à população positiva ou negativa, constituindo-se em critério mais rigoroso de classificação dos animais do que a anterior.

Tabela 2. Resultados sorológicos das matrizes de todos os rebanhos, nas três classes (negativos, suspeitos e positivos), obtidos pelos teste de ELISA baseado em LPS-CL, polivalente para os sorotipos 3, 5 e 7.

Rebanho ¹	Negativo	Suspeito	Positivo	Prevalência (%)	Total ²
1	4	15	78	80,40	97
2	2	11	83	86,45	96
3	2	9	91	89,21	102
4	5	13	91	83,48	109
5	3	9	89	10,11	101
6	6	22	70	71,42	98
7	0	6	94	94,00	100
8	13	24	65	63,72	102
9	4	19	76	76,76	99
10	39	13	53	50,47	105
11	86	5	9	9,00	100
12	11	47	41	41,41	99
13	83	23	0	0,00	106
14	9	20	68	70,10	97
15	5	9	88	86,27	102
16	22	6	71	71,71	99
17	2	8	89	89,89	99
18	82	0	0	0,00	82
19	97	1	0	0,00	98
20	105	1	0	0,00	106

¹Rebanhos de 1 a 10 com isolamento prévio de App para um dos sorotipos componentes do teste; ²Número de animais testados

Entre os rebanhos positivos, apenas três apresentaram resultados sorológicos em leitões com valores preditivos positivos aceitáveis, indicando que nesses rebanhos há circulação do agente (2, 4 e 10). No restante dos rebanhos, tanto a prevalência quanto os valores preditivos nos leitões foram baixos. Isso sugere que a disseminação do agente entre esses animais é limitada, ao menos no período em que se realizou a sorologia (9 e 15 semanas). A existência de dois perfis distintos de disseminação da infecção nos rebanhos avaliados pode estar associada às características do sorotipo envolvido, à imunidade de rebanho e às condições ambientais e de manejo que favorecem ou dificultam a eliminação do agente entre as diferentes categorias de suínos num mesmo rebanho.

Os animais mais susceptíveis à infecção são aqueles na faixa de 11 semanas de idade (Kume et al., 1984). Considerando-se que a soroconversão, em animais experimentais, ocorreu entre a primeira e a segunda semanas (sorotipos 5 e 7) e entre a segunda e a quarta semanas (sorotipos 3) após a exposição ao agente (Machado, 1997), é de se esperar que entre os leitões mais velhos houvesse mais reatores positivos. Isso de fato ocorreu. Dos 108 leitões soroconversores observados entre todos os rebanhos considerados positivos, 26 (24,1%) tinham idade entre 9 e 11 semanas e 82 (75,9%) idades entre 12 e 15 semanas.

Entre os rebanhos classificados como negativos, seis em dez apresentaram matrizes positivas, cinco deles com valores preditivos altos, 96 a 99%, e um com valor preditivo igual a 56%, indicando que o teste pode ter baixa especificidade. Esses rebanhos poderiam estar infectados de forma subclínica por alguns dos sorotipos detectados pelo teste para sorotipos 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (Machado, 1997c), uma vez que quatro desses rebanhos possuem a mesma fonte de animais. Essa última hipótese é possível porque algumas amostras do sorotipo 3, isoladas em outros países, são consideradas de baixa patogenicidade, enquanto que os sorotipos 6 e 12 raramente causam problemas (Jensen, 1995). Outra explicação para a baixa especificidade seria a de que o teste sorológico poderia estar detectando uma reação dos animais à presença de uma amostra App não sorotipável (antígeno capsular), porém com a mesma estrutura lipossacarídica. Em um estudo complementar, tentando associar sorologia com presença bacteriana em leitões, o App foi isolado em três rebanhos inicialmente considerados negativos, sendo que dois eram sorologicamente

positivos e um negativo. Desses rebanhos sorologicamente negativos, foram isoladas 31 amostras de App não sorotipificadas, suportando a última hipótese aventada. Para aumentar a especificidade do resultado do ELISA, seria necessário procurar o agente nos rebanhos positivos ou aplicar um teste sorológico mais específico. Por exemplo, um soro positivo no teste de ELISA polivalente poderia ser submetido a um teste de ELISA baseado em cápsula purificada com antígeno monovalente, que além de aumentar a especificidade do resultado poderia também identificar o sorotipo existente no rebanho, uma vez que os sorotipos conhecidos são identificados por antígenos capsulares.

CONCLUSÕES

O teste de ELISA polivalente baseado em LPS – CL contra os sorotipos 3, 5 e 7 do App possui alta sensibilidade e, aparentemente, baixa especificidade, portanto tem características de teste de triagem, uma vez que detecta os sorotipos prevalentes no Brasil e aqueles que possuem LPS – CL homólogos (3, 4, 5, 6, 7 e 8).

BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, T.W. Classification of observations. In: ANDERSON, T.W. *An introduction to multivariate statistical analysis*. New York: John Wiley, 1958. p.126-152. [[Links](#)]

BOSSÉ, J.T., FRIENDSHIP, R., ROSENDAL, S. Evaluation of a pooled-antigen ELISA for serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 5 and 7 infections. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12, 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague: IPVS, 1992a. p.220. [[Links](#)]

BOSSÉ, J.T., JOHNSON, R.P., NEMEC, M. et al. Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infec. Immunol.*, v.60, p.479-484, 1992b. [[Links](#)]

BUNKA, S., FRANZ, B., JECKSTADT, S. A mixed antigen ELISA for the detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 3, 7 and 9. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12, 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague: IPVS, 1992. p 221. [[Links](#)]

FENWICK, B. Critical comparison of the serologic tests used to diagnose porcine pleuropneumoniae. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12, 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague: IPVS, 1992. p.226. [[Links](#)]

GOTTSCHALK, M., LACOUTURE, S., LASALLE, F., et al. The use of a pool of antigens for the detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 3 (6-8) and 7. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12, 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague: IPVS, 1992. p.219. [[Links](#)]

GUNNARSSON, A. Evaluation of different antigens in the complement-fixation test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*parahaemolyticus*) infections in swine. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.1564-1567, 1979. [[Links](#)]

GUNNARSSON, A., BIBERSTEIN, E.L., Hurvell, B. Serologic studies on porcine strains of *Haemophilus parahaemolyticus* (*pleuropneumoniae*): agglutination reactions. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, p.1111-1114, 1977. [[Links](#)]

HUTRERA, V., PIJOAN, C. Agar hemolysis inhibition assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pig serum. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 12, 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague: IPVS, 1992. p.218. [[Links](#)]

JACOBSON, R.H., DOWNING, D.R. *KELA acquisition, management and analysis of ELISA data*. Ithaca: Cornell University, 1991, 71p. [[Links](#)]

KILIAN, M., NICOLET, J., BIBERSTEIN, L. Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* and proposal of a neotype strain. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.28, p.20-26, 1978. [[Links](#)]

KUME, K., NAKAI, T., SAWATA, A. Isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* from the cavities of healthy pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v.46, p.641-647, 1984. [[Links](#)]

MACHADO, H.G. *Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico de infecções provocadas pelos sorotipos 3, 5, 7 de Actinobacillus pleuropneumoniae (App)*. Pelotas: UFPel, 1997c. 89p. (Dissertação, Mestrado). [[Links](#)]

MACHADO, H.G., PIFFER, I.A., GUIDONI, A.L. et al. Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico de infecções provocadas pelos sorotipos 3, 5, 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 8, 1997, Foz do Iguaçu. *Anais...* Concórdia: EMBRAPA-CNPISA, 1997a. p.185-186. [[Links](#)]

MACHADO, H.G., PIFFER, I.A., KLEIN, C.S. et al. Persistência de anticorpos contra os sorotipos prevalentes *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) detectados por testes de ELISA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2, 1997, Foz do Iguaçu. *Anais...* Concórdia: EMBRAPA-CNPISA, 1997b. p.187-188. [[Links](#)]

MITTAL, R. K., HIGGINS, R., LARIVIÈRE, S. et al. A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, p.715-719, 1984. [[Links](#)]

MORES, N., SOUZA, J.C.A, NOGUEIRA, R.H.G. Estudo experimental da pleuropneumonia suína causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* (Hpp). Patogenicidade e evolução das lesões anatomopatológicas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.36, p.679-693, 1984. [[Links](#)]

NICOLET, J. Sur l'hémophilose du porc. III. Différenciation sérologique de *Haemophilus parahaemolyticus*. *Zentralbl. Bacteriol. (A)*. v.216, p. 487-495, 1971. [[Links](#)]

NICOLET, J., PAROZ, P., KRAWINKLER, M., et al. An enzyme-linked immunosorbent assay, using an EDTa-extracted antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, p.2139-2142, 1981. [[Links](#)]

NIELSEN, R. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 9. *Acta Vet. Scand.*, v.26, p.501-512, 1985a. [[Links](#)]

NIELSEN, R. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 10. *Acta Vet. Scand.*, v.26, p.581-585, 1985b. [[Links](#)]

NIELSEN, R. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet. Scand.*, v.27, p.453-455, 1986a. [[Links](#)]

NIELSEN, R. Serology of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* serotype 5 strains: establishment of subtypes A and B. *Acta Vet. Scand.*, v.27, p.49-58, 1986b. [[Links](#)]

NIELSEN, R., O'CONNOR, P.J. Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8. *Acta Vet. Scand.*, v.25, p.96-106, 1983. [[Links](#)]

PIFFER, I.A., BOTOVCHENCO, A., MORES, N. Teste de soroaglutinação em microtitulação com 2-mercaptoetanol para o diagnóstico de infecção por *Haemophilus pleuropneumoniae*. 2. In: CONGRESSO LATINO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 8, 1985, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: ABRAVES, 1985. p.105-106. [[Links](#)]

PIFFER, I.A., KLEIN, C.S., FÁVERO, M. et al. Caracterização bioquímica e sorológica de 55 amostras de *A. pleuropneumoniae* isoladas no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.49, p.123-129, 1997. [[Links](#)]

ROSENDAL, S., BOYD, D.A. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. *J. Clin. Microbiol.*, v.16, p.840-843, 1982. [[Links](#)]

ROSENDAL, S., LOMBIN, L, DEMOOR, J. Serotyping and detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* by indirect fluorescent antibody technique. *Can. J. Comp. Med.*. v.47, p.1-5, 1983. [[Links](#)]

SAS INSTITUTE INC. *SAS users guide: Statistics*, version 5 edition. Cary: SAS Institut, 1990. 956p. [[Links](#)]

TYLER, J.W, CULLOR, J.S. Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.194, p.1550-1558, 1989. [[Links](#)]

All the contents of this journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution License

Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567
30123-970 Belo Horizonte MG - Brazil
Tel.: (55 31) 3409-2041
Tel.: (55 31) 3409-2042

 e-Mail

abmvz.artigo@abmvz.org.br