

SEPTICEMIA HEMORRÁGICA (SEROTIPOS 6:B Y 6:E DE *PASTEURELLA MULTOCIDA*)

RESUMEN

La septicemia hemorrágica (SH) es una enfermedad importante del ganado vacuno y de los búfalos caracterizada por una septicemia aguda y fatal con una alta morbilidad y mortalidad. Está causada por algunos serotipos de *Pasteurella multocida* que se restringen geográficamente a ciertas zonas de Asia, África, Oriente Medio y el sur de Europa.

El diagnóstico de la SH se basa en el aislamiento del microorganismo causante, *P. multocida*, en general a partir de la sangre o de la médula de un animal muerto, mediante la aplicación de métodos biológicos y de cultivo, así como la identificación del microorganismo mediante métodos bioquímicos, serológicos y moleculares.

Aislamiento y detección del agente: Se pueden obtener cultivos puros de *P. multocida* sembrando en estría muestras en medios de cultivo artificiales, y su identificación posterior en base al estudio de los rasgos morfológicos, de cultivo y bioquímicos de *P. multocida*.

Convencionalmente, la identificación del serotipo específico se lleva a cabo utilizando uno o varios métodos serológicos. Estos incluyen la prueba rápida de aglutinación en portaobjetos, la hemoaglutinación indirecta para la tipificación “capsular” utilizando eritrocitos de oveja recubiertos con extractos bacterianos, la tipificación “somática” mediante las pruebas de inmunodifusión en gel de agar, utilizando extractos celulares desnaturalizados por calor, o mediante la aglutinación empleando células tratadas con ácido. La confirmación de las cepas puede efectuarse mediante la utilización de técnicas moleculares.

Serología: Normalmente, no se utilizan las pruebas serológicas para detectar anticuerpos específicos con fines diagnósticos

Requisitos para las vacunas: Las vacunas eficaces contra la septicemia hemorrágica son bacterinas simples tratadas con formalina, o preparaciones densas de bacterinas con adyuvantes. Estos últimos aumentan el nivel de inmunidad y la prolongan.

Los inóculos de los cultivos para la producción de vacunas deben contener microorganismos capsulados. Las vacunas se estandarizan teniendo en cuenta la densidad bacteriana mediante pruebas de turbidez y el peso seco bacteriano. Se llevan a cabo pruebas de potencia en ratones y/o conejos.

A. INTRODUCCIÓN

La septicemia hemorrágica (SH) es una enfermedad importante del ganado y de los búfalos que tiene lugar en forma de catastróficas epizootias en muchos países de África y Asia, produciendo una gran morbilidad y mortalidad (Bain *et al.*, 1982; Carter & De Alwis, 1989; De Alwis, 1992; Mustafa *et al.*, 1978; Shivachandra *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 1996). Se ha registrado la enfermedad en mamíferos salvajes de diversos países asiáticos y europeos (Carigan *et al.*, 1991; Rosen, 1981). En muchos países asiáticos, la mayoría de los brotes tienen lugar en las condiciones climáticas típicas del monzón (humedad y temperaturas elevadas). La enfermedad está causada por *Pasteurella multocida*, un cocobacilo gramnegativo que vive principalmente como comensal en la nasofaringe de los animales. El serotipo asiático B:2 y el serotipo africano E:2 (en el sistema de Carter y Heddleston), que se corresponden con el 6:B y el 6:E (en el sistema de Namioka–carter), son los principales responsables de la enfermedad (26). En los rumiantes salvajes, el serotipo B:2,5 es el más frecuente, mientras que el serotipo B:3,4 también se ha observado en el gamo (Aalbæk *et al.*, 2009). En la India se ha observado se han asociado otros serotipos, a saber, A:1, A:3, con un trastorno tipo SH en el ganado vacuno y en los búfalos (Kumar *et al.*, 1996; 2004). La distribución geográfica de la SH incluye ciertas zonas de Asia, África, Oriente Medio y el sur de Europa. A:1, A:3 nunca se han confirmado en México, Centro América ni Sudamérica.

Los signos clínicos de la SH causada por las cepas de B:2 o E:2 son la fiebre, la dificultad respiratoria con rинorrea, la expulsión de espuma por la boca, la postración y finalmente el decúbito y la muerte. La infección por los serotipos A:1 y A:3 provoca principalmente neumonía con resultado de muerte. La septicemia es el rasgo más característico en todas las formas de la enfermedad. El período de incubación va de los 3 a los 5 días. En casos hiperagudos, puede observarse muerte sin signos clínicos previos (Carter & De Alwis, 1989; De Alwis, 1992). Los búfalos son, por lo general, más susceptibles a la SH que el ganado vacuno, y muestran formas más graves de la enfermedad con signos clínicos muy evidentes. Un rasgo característico de la enfermedad es la presencia de un edema subcutáneo en la mandíbula, el cuello y el pecho. En zonas endémicas, la mayor parte de las muertes se restringen a los terneros de mayor edad y a los adultos jóvenes.

En el examen postmortem, la mayoría de animales que han muerto por SH presentan una destacada hinchazón del cuello causada por un intenso edema sanguinolento. También hay abundantes hemorragias petequiales en muchos tejidos y órganos, en concreto en las serosas. Las cavidades torácica, pericárdica y abdominal pueden contener líquido serosanguinolento. Los pulmones están muy congestionados y edematosos, y en general hay espuma en la cavidad nasal, la tráquea y los bronquios. Microscópicamente, se observa neumonía intersticial y edema pulmonar, así como infiltrados focales de neutrófilos y macrófagos en muchos tejidos. Todas estas lesiones son similares a las observadas en casos de sepsis grave y shock septicémico grave.

Pueden tener lugar masivas epizootias en las zonas endémicas y en las no endémicas (Carter & De Alwis, 1989; De Alwis, 1992). Se ha identificado a la SH como una complicación secundaria en el ganado vacuno y los búfalos que tiene lugar después de brotes de fiebre aftosa (FA). Los casos mortales se aproximan al 100% si no se aplica el tratamiento en el primer estadio de la infección (Carter & De Alwis, 1989; De Alwis, 1992). Para lograr una reducción efectiva de la mortalidad de los casos deben escogerse los antibióticos adecuados en función de los resultados de los antibiogramas, puesto que están emergiendo cepas resistentes de *P. multocida* (Shivachandra *et al.*, 2011).

El diagnóstico de la enfermedad se basa en los signos clínicos, las lesiones macroscópicas, y los patrones de morbilidad y mortalidad. La confirmación requiere el aislamiento y la caracterización del agente patógeno mediante técnicas convencionales y moleculares. No existen informes confirmados de infecciones humanas por *P. multocida* B2 ni E2; no obstante, otros serotipos causan infecciones humanas, por lo que deben tomarse precauciones para evitar la exposición. Este microorganismo debe manipularse aplicando procedimientos de bioseguridad y bioprotección adecuados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones para los animales*).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos existentes y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente¹						
Aislamiento bacteriano	–	–	+	+++	+	–
Detección de antígeno	–	–	+	+++	+	–
Prueba de patogenicidad en ratón	–	–	+	+++	+	–
CIEP	–	–	+	+++	+	+

1 Se recomienda combinar varios métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Prueba de aglutinación rápida en portaobjetos	–	+	+	+++	–	–
PCR	–	+	+	+++	+	–
PCR en tiempo real	–	+	+	+++	+	–
Detección de respuesta inmunitaria						
IHA	–	+	+	++	+	+++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito
 CIEP = contraelectroforesis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; IHA = hemaglutinación indirecta.

1. Aislamiento y detección del agente patógeno

1.1. Métodos de cultivo y bioquímicos

En la SH, se produce una verdadera septicemia en la fase terminal de la enfermedad. Por tanto, deben extraerse muestras de sangre de los animales enfermos inmediatamente antes de la muerte. Los animales que se encuentran en las primeras fases de la enfermedad no contienen *P. multocida* en la sangre. Las bacterias tampoco están siempre presentes en las secreciones nasales ni líquidos corporales de los animales enfermos. Las muestras de sangre obtenidas de animales enfermos que estén siendo tratados con antibiótico pueden no indicar la presencia de la bacteria debido a su supresión en la circulación.

Una muestra de sangre o un hisopo de corazón son muestras adecuadas si se toman inmediatamente después de la muerte. Si el animal lleva muerto mucho tiempo, para el aislamiento bacteriano se pueden tomar muestras de médula ósea de un hueso largo (húmero, fémur, tibia, etc). Si no se dispone de instalaciones para un examen postmortem, se puede obtener sangre de la vena yugular por incisión y/o aspiración. Las muestras de sangre deben enviarse en hielo por cualquier medio estándar de transporte y bien empaquetadas, para evitar posibles fugas. Si las muestras de sangre no van a transportarse al laboratorio en unas horas, pueden congelarse. No obstante, la congelación y descongelación reiteradas pueden destruir el microorganismo, y no son aconsejables.

Los frotis de sangre de los animales infectados se tiñen con las tinciones de Gram, de Leishman o con azul de metileno. Los microorganismos tienen aspecto de bacilos cortos gramnegativos y con tinción bipolar. No se puede establecer un diagnóstico definitivo basado solamente en el examen microscópico directo.

Se cultivan las muestras de sangre o los hisopos después de su lavado en 2–3 ml de solución salina fisiológica estéril. Como alternativa, la superficie de un hueso largo se desinfecta con alcohol y se abre por rotura. Se extrae la médula ósea en condiciones asépticas y se cultiva. Normalmente el cultivo directo resulta satisfactorio solo si la muestra es fresca y está libre de contaminantes o invasores postmortem que pudieran enmascarar el crecimiento de cualquier *Pasteurella* presente.

En los exámenes biológicos, se inocula por vía subcutánea o intramuscular a ratones un pequeño volumen (0,2 ml) del líquido de lavado de los hisopos impregnados de sangre o contenido nasal o con una porción de tejidos/médula ósea en solución salina. El ratón sirve normalmente como un “filtro” biológico para los microorganismos extraños. Si hay *P. multocida* viable, los ratones mueren a las 24–36 horas de la inoculación, y se puede comprobar en los frotis de sangre (preferiblemente cardíaca) un

crecimiento puro de *P. multocida*. Por lo general, se pueden obtener cultivos puros de *P. multocida* a partir de muestras de sangre de ratones, incluso aunque las muestras originales (muestras de hisopo y tejido nasal) procedan de canales relativamente viejas. El microorganismo puede identificarse por sus características morfológicas y de cultivo, por las reacciones bioquímicas y mediante pruebas serológicas. En el aislamiento bacteriano, como última opción se puede utilizar el método de la inoculación en ratón, sobre todo a partir de materiales nasales/tisulares muy contaminados.

Un medio bacteriológico adecuado para el crecimiento de *Pasteurella* es el de caseína/sacarosa/extracto de levadura (CSY) solidificado con agar y que contenga un 5% de sangre. La composición de este medio incluye: hidrolizado de caseína (3 g), sacarosa (3 g), extracto de levadura (5 g), cloruro sódico (5 g), ortofosfato hidrógeno dipotásico anhidro (3 g) y agua destilada hasta 1 litro. El pH se ajusta a 7,3–7,5, después de lo cual se añade agar al 1,5%. El medio se esteriliza mediante autoclave a una presión de 1 bar durante 15 minutos. Después de enfriar a 45–50°C, se añade sangre de ternero al 5% (libre de anticuerpos frente a *P. multocida*) (Wijewardana *et al.*, 1986). También puede emplearse agar sangre convencional.

P. multocida acabada de aislar en agar sangre forma colonias lisas, brillantes, de aspecto grisáceo y traslúcido, de aproximadamente 1 mm de diámetro, después de 24 horas de incubación a 37°C. Las colonias obtenidas en el medio sólido CSY son de mayor tamaño. Los cultivos viejos, en particular los obtenidos con los medios que carecen de sangre, pueden producir colonias más pequeñas. *Pasteurella multocida* no crece en el medio sólido de MacConkey. Los frotis de sangre o de tejido teñidos por el método de Gram muestran cocobacilos gramnegativos, cortos, ovoides y de tinción bipolar. Se puede observar un cierto grado de pleomorfismo, en concreto en los cultivos viejos, con bacilos más largos, de longitud variable. La tinción bipolar es más evidente con azul de metileno o con el colorante de Leishman.

Los microorganismos causantes de la SH son oxidasa, catalasa e indol positivos y reducen los nitratos a nitritos. No producen sulfhídrico ni ureasa, y son incapaces de utilizar el citrato ni de licuar la gelatina. Siempre fermentan la glucosa y la sacarosa con producción exclusiva de ácido. La mayor parte de las cepas también fermentan el sorbitol. Algunas cepas fermentan la arabinosa, la xilosa y la maltosa, mientras que la salicina y la lactosa casi nunca son fermentadas.

Una propiedad de las cepas de *P. multocida* que causan la SH es su capacidad de producir la enzima hialuronidasa (Carter y Chengappa, 1980). Después de identificar el género y la especie a partir de las características del cultivo y por pruebas bioquímicas, la producción de hialuronidasa se puede utilizar como una prueba específica para las pasteurelas que causan la SH. Debe advertirse que los serotipos B, excepto el B.2 (o 6:B), y el tipo E no producen hialuronidasa.

Se siembra un cultivo productor de ácido hialurónico en el centro de una placa de medio sólido con dextrosa y almidón. El cultivo de *Pasteurella* en el que se va a investigar la producción de hialuronidasa se siembra en estría en ángulos rectos. Las placas se incuban durante 18 horas a 37°C. Originariamente se utilizaba *Streptococcus equi* como productor de ácido hialurónico, pero en la actualidad es más adecuado un cultivo de *P. multocida* de tipo A, con cápsula mucosa. En el punto de intersección, el crecimiento de la cepa mucosa productora de ácido hialurónico se verá disminuido hasta una fina línea de crecimiento, indicando la producción de hialuronidasa por el cultivo analizado. El uso de placas con medios recién preparados y un incubador con humidificación facilita la producción de ácido hialurónico y, por consiguiente, la interpretación de la prueba.

1.2. Métodos de serotipificación

Se utilizan varias pruebas de serotipificación para la identificación de los serotipos de *P. multocida* que causan la SH. Estas incluyen una prueba rápida de aglutinación en porta (Namioka & Murata, 1961a), una prueba de hemoaglutinación indirecta (IHA) para la tipificación capsular (Carter, 1955), una prueba de aglutinación con células tratadas con ácido clorhídrico para la tipificación somática (Namioka & Murata, 1961b), la prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID) (Anon, 1981; Heddeleston *et al.*, 1972; Wijewardana *et al.*, 1982), y la prueba de contra-inmunolectroforesis (CIEP) (Carter & Chengappa, 1981).

Para la mayor parte de estas pruebas se preparan sueros hiperinmunes en conejos contra las cepas específicas de referencia. Se siembran cultivos de caldo CSY líquido (después de 6–8 horas de incubación) en medio sólido CSY con sangre. Después de incubarlos toda la noche (18–20 horas) las células se lavan con solución salina fisiológica que contenga un 0,3% de formalina. La turbidez de la suspensión celular se ajusta a la de un tubo número 4 de la escala de MacFarland. A intervalos de 3–4 días los conejos se inoculan subcutánea o intramuscularmente con 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 y finalmente con 2,0 ml de esta suspensión. Una semana después de la última inyección, los conejos se inoculan subcutánea o intramuscularmente con 0,5 ml de una suspensión celular similar, pero viva. Los

animales se sangran 10 días después. El suero se guarda a -20°C , pero, para el uso habitual, se guardan pequeñas cantidades a 4°C a las que se habrá añadido mertiolato al 1/10.000.

1.2.1. Prueba rápida de aglutinación en portaobjetos (tipificación capsular)

Se mezcla una sola colonia en una porta con una gota de solución salina, se añade una gota de antisuero, y se calienta suavemente el porta. En 30 segundos aparece una aglutinación floculada y granulosa. Los cultivos viejos pueden presentar una aglutinación granular fina que tarda más en aparecer.

1.2.2. Prueba de la hemaglutinación indirecta (tipificación capsular)

En un principio esta prueba se realizaba utilizando eritrocitos humanos de tipo "O" sensibilizados con el antígeno (Carter, 1955), pero más recientemente se han utilizado eritrocitos de oveja (Sawada *et al.*, 1985; Wijewardana *et al.*, 1986). El antígeno se prepara como sigue:

Un caldo de cultivo de 6–8 horas, de una cepa de referencia, se siembra en medio sólido CYS con sangre y se incuba toda la noche a 37°C . Las células se recolectan en 3 ml de solución salina fisiológica que contenga un 0,3% de formalina. Esta suspensión se calienta luego a 56°C durante 30 minutos, se centrifuga a 3.000 **g** durante 15 minutos a 4°C , y el líquido sobrenadante claro se guarda a -20°C . Si no se dispone de una centrífuga refrigerada, la centrifugación a 1.500 **g** durante 30 minutos permite obtener un sobrenadante líquido. Este se utiliza como el extracto antigénico. Se sigue un procedimiento similar para preparar un extracto antigénico a partir de una cepa desconocida que se desee tipificar.

Por otro lado, se recoge sangre de oveja, con un anticoagulante, en condiciones asépticas y se centrifuga a 500 **g** durante 10 minutos. Los eritrocitos sedimentados se lavan tres veces con solución salina fisiológica estéril. El extracto antigénico procedente de una cepa problema preparado por el método descrito anteriormente se utiliza para sensibilizar los eritrocitos o se absorbe a los mismos. Esto se lleva a cabo añadiendo a los eritrocitos 15 volúmenes del extracto antigénico e incubando la mezcla 1 hora a 37°C con agitación frecuente. Los eritrocitos sensibilizados se recogen por centrifugación, se lavan tres veces con solución salina fisiológica estéril, y se hace una suspensión final al 1% en solución salina fisiológica. El antisuero hiperinmune de tipo específico (tres volúmenes) se absorbe durante 30 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de los eritrocitos sedimentados (un volumen), y a continuación se centrifuga a 500 **g** por 10 minutos para sedimentar los eritrocitos. El antisuero absorbido se inactiva luego mediante calentamiento a 56°C durante 30 minutos.

La prueba se puede realizar en tubos o en placas, y se lleva a cabo en dos filas. La prueba descrita a continuación corresponde a la realización en placas de microtitulación estándar.

- i) El extracto capsular de la cepa desconocida se prepara como se ha indicado anteriormente y se utiliza para sensibilizar los eritrocitos de oveja. Los sueros hiperinmunes específicos de serotipo conocidos que se han obtenido en conejos contra los tipos A,B,D y E se diluyen del siguiente modo:
- ii) Utilizando cuatro filas separadas, los primeros pocillos de cada una se llenan con 0,72 ml de solución salina y los siguientes seis pocillos, o más, con 0,4 ml.
- iii) Cada uno de los sueros hiperinmunes específicos de tipo se diluye separadamente en cada fila añadiendo 0,08 ml del suero al primer pocillo y mezclando con una pipeta. Se transfieren 0,4 ml de este pocillo al siguiente, se mezcla, y el proceso se repite hasta el pocillo siete. Esto supone una dilución a 1/10 en el primer pocillo y una dilución a la mitad en cada uno de los siguientes.
- iv) Cada uno de los pocillos se rellena con 0,4 ml de eritrocitos sensibilizados con el antígeno absorbido, se agita levemente y se deja incubar a temperatura ambiente. Mediante la adición de los eritrocitos sensibilizados, las diluciones del suero de los pocillos se doblan, es decir, 1/20 en el primer pocillo, 1/40 en el segundo, y así sucesivamente. En cada realización de la prueba se incluye un control positivo, un control negativo y un control de solución salina.
- v) La primera lectura se realiza a las 2 horas y la final 18 horas después. La presencia de aglutinación de los eritrocitos por los lados de los pocillos cóncavos se considera un resultado positivo, y la formación de un botón en el centro de los pocillos como negativo. Dependiendo del tamaño de la aglutinación se establece una clasificación arbitraria de 1–4. Una cepa de serotipo desconocido se identifica por el suero hiperinmune con el que

presenta aglutinación. En caso de ausencia de aglutinación con todos los sueros, la cepa se considera como no tipificable.

Aunque la IHA puede utilizarse para tipificar cepas desconocidas, la prueba en sí es más eficaz cuando se trata de los serotipos B y E y es más fiable como prueba cuantitativa frente a estas cepas.

1.2.3. Pruebas de inmunodifusión en gel de agar

Las AGID de inmunodifusión en gel de agar se utilizan para lo que se conoce como tipificación “capsular”, así como para la tipificación “somática”, dependiendo de los antígenos y de los antisueros empleados. Se utiliza la técnica de la difusión doble. Los pocillos se incrustan en el agar solidificado siguiendo un modelo circular con un pocillo central y seis pocillos periféricos.

- i) *Tipificación capsular*: El medio de gel se prepara con un 1% de agar Noble, o un producto equivalente, en tampón fosfato 0,2 M que contenga mertiolato a una concentración final de 1/10.000 (Anon, 1981; Wijewardena *et al.*, 1982). Los antígenos y antisueros son los mismos que para la tipificación capsular por IHA (Carter, 1955). El antisuero estándar se coloca en el pocillo central, y los antígenos problema se colocan en los pocillos periféricos alternándolos con el antígeno homólogo estándar.
- ii) *Tipificación somática*: El medio del gel es agar Noble especial, o un producto equivalente, a una concentración de 0,9% en una solución de cloruro sódico al 0,85%.
- iii) Para la preparación del antígeno, se recogen las células crecidas en cada placa en 1 ml de cloruro sódico al 8,5% que contenga un 0,3% de formalina. La suspensión se calienta a 100°C durante 1 hora, las células se sedimentan por centrifugación, y el sobrenadante líquido se utiliza como antígeno.
- iv) Se preparan en pollos antisueros contra los 16 tipos somáticos (Heddleston *et al.*, 1972). La bacterina emulsionada en aceite² (1 ml) se inyecta por vía subcutánea en la zona media del cuello de pollos machos de 12–16 semanas. Tres semanas después, se inocula otra inyección intramuscular de 1 ml en el pecho, a razón de 0,5 ml a cada lado del esternón. Una semana después las aves se sangran, y el suero se separa y se conserva con 0,01% de tiomerosal y 0,06% de fenol. Los sueros se analizan frente a todos los tipos somáticos y aquellos que muestren reacción cruzada se eliminan. Algunas preparaciones de antisueros frente al B:2 pueden presentar reacción cruzada con el tipo somático 5.
- v) El antígeno problema se coloca en el pocillo central, y en los pocillos periféricos se disponen los antisueros contra los diferentes serotipos. Todos los serotipos que producen septicemia hemorrágica (cepas asiáticas y africanas) reaccionarán con el antisuero de tipo 2. Pueden presentarse reacciones cruzadas con el tipo 5.

1.2.4. Contrainmunolectroforesis

La contrainmunolectroforesis (CIEP) ha resultado ser un método rápido para la identificación de cultivos pertenecientes a los tipos capsulares B y E.

- i) *Preparación del extracto capsular*: El extracto capsular se prepara de la misma manera que la descrita para la IHA.
- ii) *Preparación de antisueros hiperinmunes*: Se preparan antisueros en conejos como en el caso de la IHA.
- iii) *Medio para la CIEP*: El medio para la CIEP consta de agarosa (2,0 g), barbital sódico (2,06 g), ácido dietil barbitúrico (0,37 g), agua destilada (180 ml) y solución de mertiolato al 1/1.000 (20 ml).
- iv) *Tampón de Veronal acetato (tampón barbital)*: El tampón barbital consta de barbital sódico (29,24 g), acetato sódico anhidro (11,70 g), ácido clorhídrico 0,1 N (180 ml), y agua destilada hasta completar 3 litros. El pH debe ser de 8,8.
- v) *Preparación de las placas*: Las placas para electroforesis se preparan recubriendo previamente los vidrios (57 mm x 70 mm) con 12 ml del medio. En una fila, se excavan siete pocillos de 4 mm de diámetro y separados entre sí por 7 mm. A 6 mm de distancia

2 Los antígenos bacterianos del caldo se cubren con un aceite mineral ligero (adyuvante) y luego se emulsifican (se estabilizan) con un agente emulsionante, en este caso lanolina (grasa de lana). Esto debe hacerse debido a que la fase acuosa que contiene la bacteria (fase líquida) no se mezcla con la fase lipídica (adyuvante). La proporción entre el aceite y el agente emulsionante varía según cada lote de lanolina y tiene que ser ajustada según corresponda. Cuanto mayor sea el porcentaje de lanolina, mayor será la estabilidad de la emulsión.

(de centro a centro) se excava un conjunto de pocillos en paralelo con el otro conjunto de pocillos.

- vi) *Procedimiento de la prueba:* Al pocillo del lado del cátodo se le añaden 20 µl de antígeno capsular, y al del lado del ánodo se añade un volumen idéntico del antisuero específico de tipo. Los controles que se incluyen en la prueba son una solución de cloruro sódico al 0,85% contra el antisuero positivo, y un extracto capsular contra el suero negativo de conejo, así como las muestras control positivas y negativas. El tanque de electroforesis se llena con tampón barbital, pH 8,8. El antígeno y el antisuero se someten a electroforesis durante 30 minutos a 150 V (25 V/cm). A continuación se examinan las placas para comprobar si hay líneas de precipitación.
- vii) *Interpretación de los resultados:* La presencia de una línea definida entre los pocillos del antígeno y del antisuero se considera un resultado positivo.

1.2.5. Pruebas de aglutinación (antígeno somático)

El antígeno somático “O” se prepara con un método similar al descrito previamente para la IHA (Namioka, 1978; Namioka & Murata, 1961b). Se siembra un cultivo problema de 6–8 horas en medio sólido CSY con sangre y se incuba toda la noche. Las células de cada placa se recogen en 2–3 ml de solución salina fisiológica que contenga un 0,3% de formalina, y se centrifugan a 3.000 **g** durante 15 minutos a 4°C (o 1.200–1.500 **g** durante 30–45 minutos a temperatura ambiente). Las bacterias depositadas se resuspenden en 25 ml de solución salina con HCl normal (cloruro sódico al 0,85% en una solución 1 N de HCl) hasta dar una opacidad aproximadamente equivalente a la de un tubo número 6 de la escala de Brown, y se incuba toda la noche. La suspensión se centrifuga de nuevo, el sobrenadante se elimina, y los restos celulares se lavan tres veces sucesivamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 5,0, 6,0 y 7,0, respectivamente.

Finalmente, se prepara en PBS a pH 7,0 una suspensión de los restos celulares, equivalente a la opacidad del tubo número 6 de Brown. Cualquier suspensión que muestre signos de aglutinación debe desecharse.

Se preparan antisueros contra suspensiones de células bacterianas completas de las cepas de referencia B:2 (SH asiática), E:2 (SH africana) y 11:B (cepa australiana 989, no productora de SH). Las pruebas de aglutinación se realizan en un porta y el antígeno problema se emplea contra los tres tipos de sueros. Una aglutinación fina y granular indica una aglutinación somática específica. La realización de las pruebas utilizando antígenos estándar facilitará la lectura y la interpretación. Cuando tiene lugar una aglutinación parcial inespecífica, las pruebas realizadas con diluciones decimales del suero contra los antígenos problema y contra los antígenos estándar pueden ayudar a identificar el antígeno somático.

1.2.6. Designación de los serotipos

En general, se adoptan dos sistemas de serotipificación. Uno es la tipificación capsular mediante la IHA de Carter (Carter, 1955) o por pruebas AGID (Anon, 1981; Wijewardena *et al.*, 1982). El otro es la tipificación “somática” mediante el método de Namioka & Murata (Namioka, 1978; Namioka & Murata, 1961b; 1961c) y por el método de Heddelston *et al.* (1972). Existe un acuerdo generalizado de que la designación de los serotipos debe basarse en una combinación somático-capsular. Dos sistemas que se usan normalmente son el de Namioka–Carter y el de Carter–Heddelston. En el primer sistema, los serotipos de SH asiática y africana se designan respectivamente como 6:B y 6:E, mientras que en el último se designan como B.2 y E.2, respectivamente.

1.3. Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

1.3.1. PCR específica para *Pasteurella multocida*

La tecnología de la PCR puede aplicarse para la detección rápida, sensible y específica de *P. multocida* (Mifflin & Blackall, 2001; Townsend *et al.*, 1998a). La rapidez y especificidad de dos de las PCR específicas para *P. multocida* (Mifflin & Blackall, 2001; Townsend *et al.*, 1998a) permiten una eficacia óptima sin necesidad de una hibridación adicional. Las PCR específicas para *P. multocida* (Mifflin & Blackall, 2001; Townsend *et al.*, 1998a) identifican todas las subespecies de *P. multocida*. Se ha descrito que la PCR de Mifflin & Blackall (Mifflin & Blackall, 2001) dio un falso positivo tanto con *P. avium* biovar 2 como con *P. canis* biovar 2, mientras que la PCR de Townsend *et al.* PCR (1998a) dio un falso positivo con *P. canis* biovar 2 (no se ha utilizado contra *P. avium* biovar 2). Recientemente, tanto *P. avium* biovar 2 como *P. canis* biovar 2 han sido rebautizados como *P. multocida* (Christensen *et al.*, 2004), lo que significa

que las PCR de Townsend *et al.* (1998a) y de Mifflin & Blackall (Mifflin & Blackall, 2001) se consideran actualmente como específicas para *P. multocida*. Pero aún persisten algunas dificultades, puesto que se sabe que los microorganismos similares a *P. multocida* negativos a la sacarosa procedentes de heridas grandes por mordedura de gato forman dos grupos. Mientras que los dos son positivos según la PCR específica para *P. multocida* en el estudio de Mifflin & Blackall (2001), sólo un grupo ha sido confirmado como verdaderamente *P. multocida* por otros métodos genotípicos (Christensen *et al.*, 2005). La PCR de Townsend *et al.* (1998a) se describe en el párrafo siguiente.

Se transfiere directamente una fracción de una colonia aislada del microorganismo sospechoso a la mezcla de PCR. Como alternativa, puede obtenerse ADN molde de 2 µl de un cultivo puro o mixto en medio líquido. Todos los métodos utilizados actualmente para la preparación del ADN molde proporcionan resultados reproducibles con los cebadores KMT1 (Townsend *et al.*, 1998a), y permiten la detección de ≤ 10 microorganismos por reacción. La sensibilidad y especificidad de la PCR específica para *P. multocida* representa el argumento más convincente para el uso de la tecnología de PCR en la investigación de laboratorio en casos sospechosos de SH. Se puede detectar *Pasteurella multocida* independientemente de la pureza de la muestra, lo que supone una ventaja si esta procede de una canal antigua o de hisopos de las amígdalas o nasales. En tales casos, se deben inocular los hisopos que contienen la muestra en 2 ml de medio CSY líquido e incubar en rotación durante 2–4 horas; luego se añaden 2 µl del cultivo directamente a la mezcla de la PCR antes de la amplificación.

Secuencias de los cebadores (Townsend *et al.*, 1998a):

PCR específica para <i>P. multocida</i> :	KMT1T7	5'-ATC-CGC-TAT-TTA-CCC-AGT-GG-3'
	KMT1SP6	5'-GCT-GTA-AAC-GAA-CTC-GCC-AC-3'

Condiciones de la PCR:

Se añade el ADN molde a la mezcla de PCR que contiene (en un volumen total de 25 µl) tampón para PCR 1x, cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) a una concentración de 200 µM, Mg Cl₂ 2 mM, 3,2 pmoles de cada cebador y 0,5 µg de ADN polimerasa *Taq*. Los parámetros del termociclador son: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, de 55°C durante 1 minuto, de 72°C durante 1 minuto; con una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Se someten 5 µl de cada muestra a electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón de desarrollo Tris-acetato (TAE) 1x a 4 V/cm por 1 hora. El gel se tiñe con bromuro de etidio al 1% y los fragmentos de ADN se visualizan por luz UV en un transiluminador.

La amplificación por PCR genera un producto de 460 pb.

1.3.2. Sistema de tipificación capsular múltiple de *Pasteurella multocida* por PCR

La identificación de los genes implicados en la biosíntesis de las cápsulas polisacáridicas de *P. multocida* A:1 (Chung *et al.*, 1998) y B:2 (Boyce *et al.*, 2000) suministró la información necesaria para determinar la región biosintética de los tres serogrupos restantes (D, E y F) (Boyce *et al.*, 2000). Es más, mediante la utilización de la PCR múltiple específica para serogrupos, pudo confirmarse la existencia de resultados contradictorios en la tipificación de algunas cepas (Townsend *et al.*, 2001). Con este conocimiento, se identificaron las secuencias específicas de serogrupo para utilizarlas como cebadores en un sistema de tipificación capsular múltiple por PCR (Townsend *et al.*, 2001). Los cebadores específicos de *P. multocida* se incluyen como un control interno para la identificación de la especie. En el sistema de tipificación capsular múltiple por PCR, la banda de amplicón que da el resultado de la tipificación puede no estar clara. En estos casos, el resultado puede mejorar eliminando de la mezcla los cebadores específicos de *P. multocida* (KMT1T7, KMT1SP6).

Secuencias de los cebadores (Townsend *et al.*, 2001):

PCR capsular múltiple:	CAPA-FWD	5'-TGC-CAA-AAT-CGC-AGT-CAG-3'
	CAPA-REV	5'-TTG-CCA-TCA-TTG-TCA-GTG-3'
	CAPB-FWD	5'-CAT-TTA-TCC-AAG-CTC-CAC-C-3'
	CAPB-REV	5'-GCC-CGA-GAG-TTT-CAA-TCC-3'
	CAPD-FWD	5'-TTA-CAA-AAG-AAA-GAC-TAG-GAG-CCC-3'
	CAPD-REV	5'-CAT-CTA-CCC-ACT-CAA-CCA-TAT-CAG-3'
	CAPE-FWD	5'TCC-GCA-GAA-AAT-TAT-TGA-CTC-3'
	CAPE-REV	5'-GCT-TGC-TGC-TTG-ATT-TTG-TG-3'
	CAPF-FWD	5'-AAT-CGG-AGA-ACG-CAG-AAA-TCA-G-3'

CAPF-REV	5'-TTC-CGC-CGT-CAA-TTA-CTC-TG-3'
KMT1T7	5'-ATC-CGC-TAT-TTA-CCC-AGT-GG-3'
KMT1SP6	5'-GCT-GTA-AAC-GAA-CTC-GCC-AC-3'

Tamaño de los fragmentos resultantes:

Serogrupo A	CAPA-FWD/CAPA-REV	1044 bp
Serogrupo B	CAPB-FWD/CAPB-REV	760 bp
Serogrupo D	CAPD-FWD/CAPD-REV	657 bp
Serogrupo E	CAPE-FWD/CAPE/REV	511 bp
Serogrupo F	CAPF-FWD/CAPF-REV	851 bp

Condiciones de la PCR:

Se añade el ADN molde a la mezcla de la PCR que contiene (en un volumen total de 25 µl) tampón para PCR 1x, cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) a una concentración de 200 µM, Mg Cl₂ 2 mM, 3,2 pmoles de cada cebador y 1 µg de ADN polimerasa Taq. En la publicación original (Townsend et al., 2001) se sugiere utilizar un programa de ciclado estandarizado como la PCR específica para *P. multocida*. Sin embargo, el programa de ciclado debe optimizarse y validarse para el modelo del termociclador que se esté utilizando. La electroforesis en gel de agarosa se lleva a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

1.3.3. PCR específica para las cepas de tipo B causantes de la SH

También es posible realizar una identificación provisional de las cepas de *P. multocida* específicas de tipo B causantes de la SH mediante la amplificación por PCR (Townsend et al., 1998a). Los cultivos de tipo B cuyo antígeno somático predominante es del tipo 2 o del tipo 5 se identifican mediante la amplificación de un fragmento de unas 620 pb con los cebadores KTSP61 y KTT72.

Secuencias de los cebadores (Townsend et al., 1998a):

PCR específica para las cepas de tipo B causantes de SH:

KTT72	5'-AGG-CTC-GTT-TGG-ATT-ATG-AAG-3'
KTSP61	5'-ATC-CGC-TAA-CAC-ACT-CTC-3'

Las condiciones de la PCR específica para cepas de tipo B causantes de la SH son como las descritas para la PCR específica de *P. multocida*. Se ha observado que estos cebadores son útiles para la identificación de las cepas del serogrupo B.

Los cebadores de la PCR para las cepas de tipo B causantes de la SH se pueden utilizar también en una PCR múltiple con los cebadores específicos de *P. multocida*, lo que disminuye drásticamente el tiempo necesario para la detección de *P. multocida* y la identificación provisional del serotipo causante de la SH. Las condiciones de la PCR múltiple son como las descritas anteriormente excepto por el hecho de que se utilizan 3,2 pmoles de cada uno de los cuatro cebadores y 1 µg de ADN polimerasa Taq. En el caso de los microorganismos sospechosos, mediante la utilización del sistema múltiple de la PCR específica para *P. multocida*/PCR específica para las cepas de tipo B causantes de la SH se puede confirmar la identidad y determinar un serotipo provisional en 3–4 horas, en comparación con las 2 semanas que puede requerir el análisis bioquímico y la serotipificación mediante los métodos convencionales.

1.3.4. PCR específica para el tipo B de *Pasteurella multocida*

Se ha observado que los cebadores que son útiles para la tipificación de las cepas del serogrupo A con varios tipos somáticos también lo son para la identificación específica de las cepas (Gautam et al., 2004).

Cebadores:

RGMA5:	5'-AAT-GT-TTG-CGA-TAG-TCC-GTT-AGA-3'
RGMA6:	5'-ATT-TGG-CGC-CAT-ATC-ACA-GTC-3'

Condiciones de la PCR:

Se añade ADN molde (50 ng) a la mezcla para PCR (en un volumen total de 25 µl) que contenga tampón para PCR 1x, cada dNTP a una concentración de 200 µM, MgCl₂ 1,5 mM,

20 pmoles de cada cebador y 1 unidad ADN polimerasa *Taq*. Las condiciones de la amplificación estándar son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 95°C durante 45 segundos, 56°C durante 45 segundos y 72 °C durante 45 segundos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 6 minutos. Los productos amplificados se separan mediante la electroforesis en gel de agarosa (gel de agarosa al 1,5%) en tampón TBE 0,5x a 5 v/cm durante 2 horas.

La amplificación por PCR proporciona un producto de 564 pb.

La prueba puede aplicarse en el cultivo directo, en las células lisadas hervidas y en los tejidos infectados

1.3.5 Sistema de tipificación de LPS de *Pasteurella multocida* mediante PCR múltiple

Las cepas de *Pasteurella multocida* se pueden clasificar en 16 serovares (serotipos) somáticos o de lipopolisacáridos (LPS) utilizando la prueba de difusión de la precipitina en gel de Heddleston. Se han identificado los genes necesarios para el ensamblaje de los LPS. El método de PCR múltiple se desarrolló para la tipificación molecular de LPS basada en genes de la estructura del núcleo externo de los LPS (Harper *et al.*, 2015).

Cebadores:

BAP6119:	5'- ACA-TTC-CAG-ATA-ATA-CA-CCCG-3'
BAP6120:	5'- ATT-GGA-GCA-CCT-AGT-AAC-CC-3'
BAP6121:	5'- CTT-AAA-GTA-ACA-CTC-GCT-ATT-GC-3'
BAP6122:	5'- TTT-GAT-TTC-CCT-TGG-GAT-AGC-3'
BAP7213:	5'-TGC-AGG-CGA-GAG-TTG-ATA-AAC-CAT-C-3'
BAP7214:	5'- CAA-AGA-TTG-GTT-CCA-AAT-CTG-AAT-GGA-3'
BAP6126:	5'- CTT-TAT-TTG-GTC-TTT-ATA-TAT-ACC-3'
BAP6125:	5'- TTT-CCA-TAG-ATT-AGC-AAT-GCC-G-3'
BAP6129:	5'- AGA-TTG-CAT-GGC-GAA-ATG-GC-3'
BAP6130:	5'- CAA-TCC-TCG-TAA-GAC-CCC-C-3'
BAP7292:	5'- TCT-TTA-TAA-TTA-TAC-TCT-CCC-AAG-G-3'
BAP7293:	5'- AAT-GA-AGG-TTT-AAA-AGA-GAT-AGC-TGG-AG-3'
BAP6127:	5'- CCT-ATA-TTT-ATA-TCT-CCT-CCC-C-3'
BAP6128:	5'- CTA-ATA-TAT-AAA-CCA-TCC-AAC-GC-3'
BAP6133:	5'- GAG-AGT-TAC-AAA-AAT-GAT-CGG-C-3'
BAP6134:	5'- TCC-TGG-TTC-ATA-TAT-AGG-TAG-G-3'

Tamaño de los fragmentos resultantes:

L1 (Heddleston Serovar 1 y)	BAP6119/ BAP6120	1307pb
L2 (Heddleston Serovar 2/5)	BAP6121/ BAP6122	810 pb
L3 (Heddleston Serovar 3 y 4)	BAP7213/ BAP7214	474 pb
L4 (Heddleston Serovar 6 y 7)	BAP6126/ BAP6125	550 pb
L5 (Heddleston Serovar 9)	BAP6129/ BAP6130	1175 pb
L6 (Heddleston Serovar 10, 11, 15, y 12)	BAP7292/ BAP7293	1668 pb
L7 (Heddleston Serovar 8 y 3)	BAP6127/ BAP6128	931 pb
L8 (Heddleston Serovar 16)	BAP6133/ BAP6134	255 pb

Condiciones para la PCR:

Cada una de las PCR múltiples finales de LPS (50 µl de volumen final) se realiza en tampón de polimerasa *Taq* 1 x (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM) que contiene cada cebador a una concentración de 0,4 µM, trifosfatos de desoxinucleósido (dNTP) a 0,2 mM, y 1,7 U de *Taq*

polimerasa. Para cada PCR de colonia, se recoge material de 2 a 3 colonias de *P. multocida* bien aisladas utilizando una punta estéril de una micropipeta de 20 µl (volumen fijado en 20 µl) e insertándola en el centro de cada colonia. A continuación, el material recogido se añade a una mezcla de PCR de 50 µl y se mezcla minuciosamente pipeteando. En el caso de la PCR que utiliza ADN genómico, se añaden aproximadamente 50 ng de ADN purificado en columna a cada mezcla de PCR. Todas las mezclas de reacción se mezclan brevemente y luego se centrifugan durante 10 segundos a 13 000 g. En el caso de la PCR de colonias, las condiciones de ciclo son 96°C durante 10 minutos, seguidas de 30 ciclos de 96°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos y 72°C durante 2,5 minutos, con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. En el caso de la PCR que usa ADN genómico como molde, las condiciones de ciclo son idénticas a las de la PCR de colonias, excepto en que el paso de desnaturalización inicial a 96°C se reduce a 5 minutos. Los productos amplificados se separan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

1.3.6 PCR en tiempo real y amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

Se ha desarrollado una PCR en tiempo real SH-est basada en el gen *diana est* (Petersen *et al.*, 2014). Detecta específicamente ST122, ST63, ST147 y ST162 asociados a SH. Sin embargo, no detecta cepas de ST151 con tipo capsular D aisladas de cerdos que sí se detectan con la PCR específica de tipo B causante de SH. La PCR en tiempo real para SH-est aporta una detección rápida y específica de los tipos específicos de *P. multocida* implicados en la SH en comparación con otras PCR.

Recientemente, se ha descrito el desarrollo de un ensayo Pm-LAMP y un ensayo HS-LAMP específico para cepas del serogrupo B:2 asociadas a SH en bovinos y búfalos (Moustafa y Bennett, 2017). Los hallazgos preliminares sugieren que el ensayo HS-LAMP tiene una alta sensibilidad y especificidad para la detección de *P. multocida* asociada a la SH. Se supone que el método Pm-LAMP debería ser una herramienta de diagnóstico útil para la detección rápida y visible de *P. multocida* a partir de diversos materiales clínicos de diversas especies hospedadoras. Sin embargo, necesita una evaluación adicional directamente en muestras clínicas, junto con su utilidad en condiciones de campo como alternativa simple a las PCR, que son metodologías sofisticadas de laboratorio.

1.3.7. Diferenciación genotípica de las cepas

Una vez que se ha realizado la identificación provisional (o definitiva), se puede lograr una identificación adicional de las cepas por métodos de determinación de la huella molecular genotípica. El análisis por endonucleasas de restricción con el enzima *HhaI* ha resultado útil para caracterizar los serotipos de tipo B causantes de SH. De 71 cepas de serotipos capsulares de tipo B de *P. multocida*, se observaron 20 perfiles de huellas de ADN. En relación con las cepas de los serogrupos causantes de la SH, se ha informado de 13 perfiles únicos de huellas entre 54 cepas semejantes al perfil de la cepa de referencia con serotipo somático 2 (Wilson *et al.*, 1992). Por el contrario, aunque se observó un perfil único de *HhaI* entre 13 cepas del serogrupo E, fue posible la diferenciación de estas cepas después de la digestión con la enzima *HpaI*. *HpaI* parece generar subdivisiones más finas que las obtenidas con el uso de *HhaI* (Wilson *et al.*, 1995). La ribotipificación y la separación por electroforesis en campo pulsante de fragmentos de ADN de gran tamaño, también permite una discriminación útil de los serogrupos B y E en cepas de *P. multocida* (Townsend *et al.*, 1997a). Podría establecerse la diversidad genética de las cepas de origen animal o aviar de *Pasteurella multocida* causantes de SH mediante análisis de la secuencia del gen que codifica la síntesis de la subunidad 16S del rARN. En un estudio llevado a cabo en el Reino Unido en el que se han empleado 79 cepas naturales recuperadas de distintas especies, se pusieron de manifiesto 19 tipos de rARN 16S que se agrupaban en dos linajes filogenéticamente diferenciados (Davies, 2004). Por otra parte, análisis de la secuencia de cepas de la India del serogrupo B de *P. multocida* de distintas especies animales no mostraron demasiada variación (Dey *et al.*, 2007). La tipificación mediante la secuenciación multilocus (MLST), un sistema de tipificación por secuencia basado en siete genes constitutivos se ha empleado para identificar la diversidad de genética de cepas bovinas de *P. multocida* y de cepas de otras especies hospedadoras (Davies *et al.* 2004; Hotchkiss *et al.*, 2011; Sarangli *et al.*, 2016; Subaaharan *et al.*, 2010). La MLST de 55 cepas aisladas de *P. multocida* asociadas a SH determinó que la mayoría incluía el tipo de secuencia (ST) 122 ($n = 50$), y en ocasiones muy infrecuentes ST63, ST147 y ST162, en comparación con otros miembros de especies aisladas de otros tipos de lesiones y hospedadores (Petersen *et al.*, 2014).

Para cualquier laboratorio con capacidad para realizar la PCR resulta posible llevar a cabo las determinación de huellas moleculares con la PCR, con varios métodos utilizados con anterioridad para diferenciar otros microorganismos de *P. multocida*. El análisis de ADN

polimórfico amplificado al azar (RAPD) y la técnica de la PCR con cebadores aleatorios (AP-PCR) han sido útiles, respectivamente, en estudios epidemiológicos de *P. multocida* aislada de conejos (Chaslus-Dancla *et al.*, 1996). El análisis de *P. multocida* mediante las secuencias repetitivas por la PCR ha permitido diferenciar entre cepas aviarias y porcinas, aunque todas las cepas analizadas que causaban la SH mostraron perfiles similares (Townsend *et al.*, 1997b; 1998b). Sin embargo, recientemente se ha hallado que existe una variabilidad molecular entre las cepas de *P. multocida* causantes de la SH y pertenecientes al serogrupo B. Se ha informado de diferenciación genotípica de cinco cepas del serotipo B de *P. multocida* mediante la utilización de la PCR palindrómica, extragénica y repetitiva (REP), la PCR de consenso, intragénica, repetitiva y enterobacteriana (ERIC) y la PCR de cebador único (Biswas *et al.*, 2004). No se ha descrito con anterioridad ningún análisis mediante RAPD y AP-PCR de cepas de *P. multocida* causantes de SH.

2. Pruebas serológicas

Por lo general, en el diagnóstico no se utilizan las pruebas serológicas para detectar anticuerpos. La IHA puede utilizarse con este fin, siguiendo un método en cierto muy similar al descrito antes para la tipificación capsular. Cuando por la prueba IHA se detectan títulos altos, el resultado indica una exposición reciente a la SH. Como la SH es una enfermedad que se presenta principalmente en los animales mantenidos en condiciones de cría poco sofisticadas, donde los sistemas de declaración de los casos de enfermedad son también deficientes, a menudo se produce un retraso considerable en la declaración de los brotes. Las muertes se producen de modo muy repentino y, cuando se declaran el caso no se dispone de canales la necropsia. En tales situaciones, a efectos de diagnóstico, la presencia de títulos altos en IHA, de 1/160 hasta 1/1280 o superiores, en los animales supervivientes que han estado en contacto con las manadas afectadas, es un indicador de la exposición reciente a la SH.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Los tres tipos de vacunas utilizadas contra la SH son las bacterinas, las vacunas precipitadas con alúmina (APV) y las vacunas con adyuvantes oleosos (OAV). Para lograr una inmunidad suficiente con las bacterinas, se requiere una vacunación repetida. La administración de bacterinas densas puede dar lugar a la aparición de reacciones de shock, que son menos frecuentes con las APV y casi inexistentes con las OAV.

Desde 1989, se ha utilizado en Myanmar una vacuna viva contra la SH, preparada con una cepa B:3,4 (cepa de gamo) no virulenta de *P. multocida* para el control de la enfermedad en el ganado vacuno y en los búfalos mayores de 6 meses. Se administra por vía intranasal mediante aerosol (Carter *et al.*, 1991; Myint *et al.*, 2005). La vacuna ha sido recomendada por la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como vacuna inocua y potente para su uso en los países asiáticos. Sin embargo, no existen informes sobre su utilización en otros países, y las vacunas muertas son las únicas que se usan en los países afectados por la SH.

Las directrices para la producción de vacunas se presentan en el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden suplementarse con los requisitos regionales y nacionales.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Se utiliza una cepa local de *P. multocida* que represente el serotipo predominante. Se debe mantener un cultivo estable y bien capsulado que produzca grandes colonias, de aproximadamente 2 mm de diámetro, en el medio sólido CSY con sangre. Debe guardarse cultivos del inóculo en un agar nutritivo semisólido a temperatura ambiente como cultivos por picadura, o como cultivos liofilizados.

Se infecta un ternero con el cultivo, y, dentro de las 2–3 horas postmortem, se toma asépticamente sangre del corazón y se guarda en alícuotas de 1 ml a –20°C. Para cada nuevo lote de vacuna se usa una alícuota nueva. Se puede subcultivar esta alícuota una o dos veces, con tal de que el tamaño de las colonias no disminuya. Se descongela una alícuota de sangre, se siembra sobre el medio sólido CSY con sangre, y se comprueba en un porta si el crecimiento resultante presenta aglutinación con el antisuero adecuado. Un buen cultivo presentará una aglutinación gruesa y floculenta, en menos de 30 segundos. Un mal cultivo solo producirá una aglutinación fina y granular.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Debe demostrarse que los lotes de siembra son:

- i) *Puros*: Exentos de agentes contaminantes.
- ii) *Inocuos*: No causan reacciones adversas en la especie de destino cuando se suministran siguiendo las recomendaciones.
- iii) *Eficaces*: Estimulan una inmunidad eficaz, como se indica en las pruebas de potencia.

Las pruebas requeridas se describen más adelante en el apartado C.2.2.4.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Para la producción de vacunas se requieren suspensiones bacterianas densas. Deben tener un contenido bacteriano mínimo de 1,5 g de peso seco por litro de suspensión. Existen dos métodos para producir suspensiones densas. El primero consiste en cultivar en medio sólido en frascos Roux y recoger en solución salina fisiológica con formalina, con lo que se pueden lograr suspensiones de cualquier densidad. Este procedimiento resulta laborioso ya que cada frasco debe ser recolectado por separado y probado en cuanto a la pureza. El segundo método es el recomendado y se basa en el uso de un gran contenedor con los cultivos aireados y en un medio que permita específicamente el crecimiento de *P. multocida*.

Existen dos tipos de proceso de aireación – por vórtex y por inyección. En la aireación por vórtex, el aire estéril se introduce con un compresor, y el cultivo se agita por la fuerza de impulsión de la columna que opera en la corriente de aire, mientras que en la aireación por inyección el aire se dispersa a través de un inyector. Una aireación intermitente parece producir un crecimiento más denso (Thomas, 1968). Cuanto más fina sea la dispersión del aire, mejor es el crecimiento bacteriano. Normalmente se emplean contenedores de 20–40 litros, y la incubación se realiza a 37°C. En sistemas de cultivo continuo, y una vez alcanzada la densidad máxima, lo que normalmente tiene lugar en un plazo de 15 horas, se recoge un 25% del volumen de trabajo y se reemplaza cada hora. Las cosechas de los cultivos continuos se recogen en volúmenes relativamente pequeños por separado, pero, después de varios días, la densidad disminuye, posiblemente debido a la pérdida del antígeno capsular. Por esta razón, son preferibles los cultivos discontinuos. Si los recipientes con cultivos discontinuos se inoculan con 50 ml/litro de medio, se obtiene una turbidez máxima en 15–18 horas, que es cuando el crecimiento se puede detener por adición de formalina a una concentración final de 0,5%. Este procedimiento, en el que se emplea un gran inóculo y el crecimiento se detiene después de un corto período, ayuda a reducir la posibilidad de contaminación. La turbidez se estandariza contra una referencia que contenga el equivalente a 1,5 g/litro, peso seco/volumen.

También se obtienen cultivos densos empleando fermentadores, en los que puede llevarse a cabo una esterilización por calor de los recipientes y del cultivo *in situ*, con sistemas automáticos de control de la temperatura, el pH y la aireación. En el fermentador también pueden incluirse sistemas de esterilización de líquidos por filtración, para componentes termolábiles. Un fermentador de lotes de 100 litros dará un mínimo de 66.000 dosis (cada una de 3 ml) de OAV, e incluso más si la densidad es lo bastante alta como para conseguir una dilución hasta un estándar de referencia equivalente a 1,5 g/litro, peso seco/volumen.

La OAV se logra emulsificando volúmenes iguales de un aceite mineral ligero y de la suspensión bacteriana, con lanolina pura anhidra al 5% como agente emulsionante. El aceite mineral y la lanolina se esterilizan primero, y después de enfriarse a 40°C, se añade a la muestra un 0,5% de formalina. La suspensión bacteriana se añade lentamente y la emulsión continúa durante otros 10 minutos. Después de dejar que se estabilice toda la noche, la mezcla se vuelve a emulsionar, se embotella y se guarda a 4°C durante 2 semanas antes de su uso.

La APV se prepara ajustando primero la turbidez de la suspensión al estándar de referencia como anteriormente, y diluyéndola con un volumen igual de solución salina fisiológica con formalina al 0,5%. El pH se ajusta a 6,5, y se añade una solución caliente al 20% de alumbre de potasio para obtener una concentración final de alumbre al 1%. Después de dejarlo toda la noche con agitación continua, la vacuna se embotella para ser utilizada.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Un medio esterilizado idóneo para el método de cultivo aireado es el que contiene hidrolizado de caseína (2 g), sacarosa (6 g), extracto de levadura (6 g), cloruro sódico (5 g), ortofosfato hidrógeno dipotasio anhidro (8,6 g), ortofosfato dihidrógeno potasio anhidro (1,36 g) y agua destilada hasta 1 litro. Se obtiene un crecimiento más denso si la caseína, la sacarosa y la levadura se preparan como concentrado, esterilizado mediante filtro o autoclave durante 10 minutos a 107°C, y se transfieren de forma aséptica al recipiente que previamente se ha esterilizado por calor con el resto de los ingredientes.

2.2.3. Controles durante el proceso

Es necesario comprobar que la concentración de la masa bacteriana, la capsulación de las bacterias, la pureza del cultivo y la eficiencia de la inactivación son las adecuadas.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad y pureza

Las pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminantes en los materiales biológicos de uso veterinario se detallan en el capítulo 1.1.9.

ii) Inocuidad

Se vacunan dos cabezas de ganado seronegativas con el doble de la dosis recomendada y se observa la presencia de efectos adversos durante un periodo de 10–14 días.

Se inoculan por vía intramuscular cinco ratones con 0,2 ml de vacuna cada uno, y se observan durante 5 días. La sangre de cualquier ratón que muera, se cultiva para comprobar si está infectada por *P. multocida*.

iii) Potencia del lote

Las pruebas de potencia se pueden realizar mediante cualquiera de los métodos siguientes:

- a) Vacunación del ganado seguida de un desafío directo o de pruebas de protección pasiva en el ratón, utilizando sueros bovinos. Este procedimiento no es muy viable ya que con la OAV en el ganado vacuno tarda bastante en desarrollarse una inmunidad suficiente.
- b) Vacunación de conejos seguida del desafío directo o prueba de protección pasiva en el ratón utilizando los sueros de conejo; o
- c) Pruebas de potencia en ratón, que es el método más factible de los tres.

Cada ratón, de un grupo de 50, se vacuna intramuscularmente con 0,2 ml de vacuna, y se repite la dosis 14 días después. Al día 21, los ratones se dividen en diez grupos de cinco, y a cada grupo se le desafía con las diluciones respectivas de un cultivo de 6–8 horas en un medio líquido de una cepa natural a niveles de 10^{-1} – 10^{-10} ; un grupo control de 50 ratones no vacunados se estimula de forma similar, y se observa a todos los ratones durante 5 días. A continuación, se puede calcular la dosis letal 50 (DL₅₀) para obtener una indicación de la dosis suficiente para proteger el ganado vacuno: las vacunas preparadas del modo descrito contienen al menos 10^4 unidades de protección en los ratones vacunados.

2.3. Requisitos para la aprobación del registro

2.3.1. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

Véase el Capítulo 1.1.8.

- ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas
Véase el Capítulo 1.1.8.

- iii) Consideraciones ambientales
Véase el Capítulo 1.1.8.

2.3.2. Requisitos de eficacia

- i) Para la producción animal

Una dosis única de vacuna administrada a terneros jóvenes de 3-6 meses de edad protegerá a los animales susceptibles durante 3-4 meses empleando APV, y durante 6–9 meses empleando OAV.

La vacuna debe administrarse por inyección intramuscular profunda. Para dosis de 3 ml se aconseja utilizar jeringas de nylon de 5 ml y una aguja de 14–15 G, y la edad recomendada para la vacunación inicial es 4–6 meses. Para la vacunación rutinaria profiláctica, se recomienda una dosis única de OAV a los 4-6 meses, un recordatorio 3–6 meses después y una revacunación anual a partir de ese momento. Cuando el sistema de producción no permita acceder a cada animal en el momento oportuno, se recomienda una vacuna anual de todos los animales aproximadamente a los 4 meses de edad, preferiblemente antes de la época reproductiva, y una vacunación de todos los terneros antes del año de edad, 6 meses después. En caso de brote en animales vacunados, se recomienda una dosis de APV seguida de una dosis de OAV.

La fuga de OAV hacia el tejido subcutáneo a veces puede dar lugar a bultos fibrosos en los puntos de inyección. En ocasiones muy infrecuentes, pueden aparecer abscesos si no se respetan las normas de esterilidad, aunque la mayoría de animales son resistentes a estas infecciones. La APV a veces puede causar reacciones de shock.

- ii) Para el control y la erradicación
No es aplicable.

2.3.3. Estabilidad

La emulsión de la OAV debe ser de color blanco puro, y adherirse al vidrio como pintura. Si la emulsión muestra signos de fragmentación, debe desecharse. Se puede permitir la separación de una capa fina de aceite en la superficie. Se puede guardar durante 6 meses a 4–8°C sin pérdida notable de potencia. No debe congelarse. El aumento de la concentración de lanolina mejora la estabilidad, pero también aumenta la viscosidad, lo que es un inconveniente importante. El uso de otros agentes emulsionantes como "Arlacel" favorece la producción de emulsiones más finas y estables.

3. Vacunas desarrolladas mediante la ingeniería genética

No es aplicable actualmente. No obstante, se están llevando a cabo varios intentos de desarrollar vacunas vivas mutantes definidas, fantasmas bacterianos y vacunas recombinantes de subunidades con los adyuvantes adecuados (Shivachandra *et al.*, 2011).

BIBLIOGRAFÍA

AALBÆK B., ERIKSEN L., RIMLER R. B., LEIFSSON P. S., BASSE A., CHRISTIANSEN T. & ERIKSEN E. (2009). Typing of *Pasteurella multocida* from haemorrhagic septicaemia in Danish fallow deer (*Dama dama*). *APMIS*, **107**, 913–920.

ANON (1981). Simple serological technique recommended for HS diagnosis. *Asian Livestock*, **6**, 41–42.

BAIN R.V.S., DE ALWIS M.C.L., CARTER G.R. & GUPTA B.K. (1982). Haemorrhagic Septicaemia. FAO Animal Production and Health Paper No. 33. FAO, Rome, Italy.

BISWAS A., SHIVACHANDRA S.B., SAXENA M.K., KUMAR A.A., SINGH V.P. & SRIVASTAVA S.K. (2004). Molecular variability among strains of *P. multocida* isolated from an outbreak of haemorrhagic septicaemia in India. *Vet. Res. Commun.*, **28**, 287–298.

- BOYCE J.D., CHUNG J.Y. & ADLER B. (2000). Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Vet. Microbiol.*, **72**, 121–134.
- CARIGAN M.J., DAWKINS H.J.S., COCKRAM E.A & HANSEN A.T. (1991). *P. multocida* septicaemia in fallow deer. *Aust. Vet. J.*, **68**, 201–203.
- CARTER G.R. (1955). A haemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, **16**, 481–484.
- CARTER G.R. & CHENGAPPA M.M. (1980). Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of haemorrhagic septicaemia. *J. Clin. Microbiol.*, **11**, 94–96.
- CARTER G.R. & CHENGAPPA M.M. (1981). Identification of type B and E *Pasteurella multocida* by counterimmuno-electrophoresis. *Vet. Rec.*, **108**, 145–146.
- CARTER G.R. & DE ALWIS M.C.L. (1989). Haemorrhagic septicaemia. In: *Pasteurella* and Pasteurellosis, Adlam C. & Rutter J.M., eds. Academic Press, London, UK, 131–160.
- CARTER G.R., MYINT A., VAN KHAR R. & KHIN A. (1991). Immunisation of cattle and buffaloes with live haemorrhagic septicaemia vaccine. *Vet. Rec.*, **129**, 203.
- CHASLUS-DANCLA E., LESAGE-DESCAUSES M.C., LEROY-SETRIN S., MARTEL J.L., COUDERT P. & LAFONT J.P. (1996). Validation of random amplified polymorphic DNA assays by ribotyping as tools for epidemiological surveys of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, **52**, 91–102.
- CHRISTENSEN H., ANGEN O., OLSEN J.E. & BISGAARD M. (2004). Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. *Microbiol.*, **150**, 1757–1767.
- CHRISTENSEN H., BISGAARD M., ANGEN O., FREDERIKSEN W. & OLSEN J. E. (2005). Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 259–270.
- CHUNG J.Y., ZHANG Y. & ADLER B. (1998). The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. *FEMS Microbiol. Lett.*, **166**, 289–296.
- DAVIES R.L. (2004). Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiology*, **150**, 4199–4210.
- DAVIES R.L. MACCORQUODALE R. & REILLY S. (2004). Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microbiol.*, **99**, 145–158.
- DE ALWIS M.C.L. (1992). Haemorrhagic septicaemia – a general review. *Br. Vet. J.*, **148**, 99–112.
- DEY S., SINGH V.P., KUMAR A.A., SHARMA B., SRIVASTAVA S.K. & SINGH N. (2007). Comparative sequence analysis of 16S rRNA gene of *Pasteurella multocida* serogroup B isolates from different animal species. *Res. Vet. Sci.*, **83**, 1–4.
- GAUTAM R., KUMAR A.A., SINGH V.P., SINGH VIJENDRA P., DUTTA T.K. & SHIVCHANDRA S.B. (2004). Specific identification of *Pasteurella multocida* serogroup A isolates by PCR assay. *Res. Vet. Sci.*, **76**, 179–185.
- HARPER M., JOHN M., TURNI C., EDMUNDS M., ST M.F., ADLER B., BLACKALL P.J., COX A.D. & BOYCE J.D. (2015). Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 477–485.
- HEDDLESTON K.L., GALLAGHER J.E. & REBERS P.A. (1972). Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.*, **16**, 925–936.
- HOTCHKISS E.J., HODGSON J.C., LAINSON F.A. & ZADOKS R.N. (2011). Multilocus sequence typing of a global collection of *Pasteurella multocida* isolates from cattle and other host species demonstrates niche association. *BMC Microbiology*, **11**, 115.

- KUMAR A.A., HARBOLA P.C., RIMLER R.B. & KUMAR P.N. (1996). Studies on *Pasteurella multocida* isolates of animal and avian origin from India. *Ind. J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.*, **17**, 120–124.
- KUMAR A.A., SHIVACHANDRA S.B., BISWAS A., SINGH V.P., SINGH V.P. & SRIVASTAVA S.K. (2004). Prevalent serotypes of *Pasteurella multocida* isolated from different animal and avian species in India. *Vet. Res. Commun.*, **28**, 657–667.
- MIFLIN J.K. & BLACKALL P.J. (2001). Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **33**, 216–221.
- MOUSTAFA A.M. & BENNETT M.D. (2017). Development of loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assays for detection of *Pasteurella multocida* and hemorrhagic septicemia-associated *P. multocida* serotype B: 2. *Am. J. Vet. Res.*, **78**, 134–143.
- MUSTAFA A.A., GHALIB H.W. & SHIGIDI M.T. (1978). Carrier rate of *Pasteurella multocida* in a cattle herd associated with an outbreak of haemorrhagic septicaemia in the Sudan. *Br. Vet. J.*, **134**, 375–378.
- MYINT A., JONES T.O. & NYUNT H.H. (2005). Safety, efficacy and cross-protectivity of a live intranasal aerosol haemorrhagic septicaemia. *Vet. Rec.*, **156**, 41–45.
- NAMIOKA S. (1978). *Pasteurella multocida*. Biochemical characteristics and serotypes. In: *Methods in Microbiology*, 10. Academic Press, London, UK, 272–292.
- NAMIOKA S. & MURATA M. (1961a). Serological studies on *Pasteurella multocida*. I: a simplified method of capsular typing of the organism. *Cornell Vet.*, **51**, 498–507.
- NAMIOKA S. & MURATA M. (1961b). Serological studies on *Pasteurella multocida*. II: characteristics of the somatic (O) antigen of the organism. *Cornell Vet.*, **51**, 507–521.
- NAMIOKA S. & MURATA M. (1961c). Serological studies on *Pasteurella multocida*. III. O antigenic analysis of cultures isolated from various animals. *Cornell Vet.*, **51**, 522–528.
- PETERSEN A., BISGAARD M., TOWNSEND K. & CHRISTENSEN H. (2014). MLST typing of *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia and development of a real-time PCR specific for haemorrhagic septicaemia associated isolates. *Vet. Microbiol.*, **170**, 335–341.
- ROSEN M.N. (1981). *Pasteurellosis Infectious Diseases of Wild Animals*, Second Ed. Davis J.B., Karstak L.H. & Trainer D.O., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 244–252.
- SARANGI L.N., THOMAS P., GUPTA S.K., KUMAR S., VISWAS K.N. & SINGH V.P. (2016). Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* circulating in India by multilocus sequence typing. *Transbound. Emerg. Dis.*, **63**, e286–292.
- SAWADA T., RIMLER R.B. & RHOADES K.P. (1985). Haemorrhagic septicaemia: naturally acquired antibodies against *Pasteurella multocida* types B and E in calves in the United States. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 1247–1250.
- SHIVACHANDRA S.B., VISWAS K.N. & KUMAR A.A. (2011). A review of haemorrhagic septicaemia in cattle and buffalo. *Animal Health Res. Reviews*, **12**, 67–82.
- SINGH V.P., KUMAR A.A., SRIVASTAVA S.K. & RATHORE B.S. (1996). Significance of HS in Asia: India. International Workshop on Diagnosis and Control of HS. Bali, Indonesia, Indonesian Department of Agriculture, 28–30 May, 1999, p.16.
- SUBAAHARAN S., BLACKALL L.L. & BLACKALL P.J. (2010). Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, **141**, 354–361.
- THOMAS J. (1968). Studies on haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine. I. Methods of production. *Kajian Vet. Malaysia–Singapore*, **1**, 152–158.
- TOWNSEND K.M., BOYCE J.D., CHUNG J.Y., FROST A.J. & ADLER B. (2001). Genetic organisation of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 924–929.
- TOWNSEND K.M., DAWKINS H.J.S. & PAPADIMITRIOU J.M. (1997a). Analysis of haemorrhagic septicaemia-causing isolates of *Pasteurella multocida* by ribotyping and field alternation gel electrophoresis (FAGE). *Vet. Microbiol.*, **57**, 383–395.
- TOWNSEND K.M., DAWKINS H.J.S. & PAPADIMITRIOU J.M. (1997b). REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia. *Res. Vet. Sci.*, **63**, 151–155.

TOWNSEND K.M., FROST A.J., LEE C.W., PAPADIMITRIOU J.M. & DAWKINS H.J.S. (1998a). Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 1096–1100.

TOWNSEND K.M., O'BOYLE D., PHAN T.T., HANH T.X., WIJEWARDANA T.G., WILKIE I., TRUNG N.T. & FROST A.J. (1998b). Acute septicaemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. *Vet. Microbiol.*, **63**, 205–215.

WIJEWARDANA T.G., DE ALWIS M.C.L. & BASTIANZ H.L.G. (1986). Cultural, biochemical and pathogenicity studies on strains of *Pasteurella multocida* isolated from carrier animals and outbreaks of haemorrhagic septicaemia. *Sri Lanka Vet. J.*, **34**, 43–57.

WIJEWARDANA T.G., DE ALWIS M.C.L. & VIPULASIRI A.A. (1982). An agar gel diffusion test for rapid identification of *Pasteurella multocida* type B (Carter). *Sri Lanka Vet. J.*, **30**, 12–14.

WILSON M.A., DUNCAN R.M., NORDHOLM G.E. & BERLOWSKI B.M. (1995). *Pasteurella multocida* isolated from wild birds of North America; A serotype and DNA fingerprint study of isolates from 1978 to 1993. *Avian Dis.*, **39**, 587–593.

WILSON M.A., RIMLER R.B. & HOFFMAN L.J. (1992). Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 1518–1524.

*
* *

NB: En el momento de la publicación (2021) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para la septicemia hemorrágica (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito