

11661

RECIBO EN OFICINA  
1/23  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

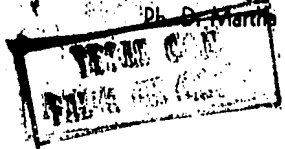
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

Citotoxicidad de Sobrenadantes de Diferentes  
Serotipos de Haemophilus Pleuropneumoniae  
Sobre Macrófagos Alveolares

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
P R E S E N T A

María del Carmen García Jiménez  
MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA  
11661

Director de Tesis: Ph.D. Carlos Pijoan Aguade  
Asesores: M. en C. Jorge Luis Tortora Pérez  
Dr. D. Martha Fuentes Rangel



1988



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	PAG.
RESUMEN	2
INTRODUCCION	3
I.1 Taxonomía y Características Bacteriológicas de <u>Haemophilus pleuropneumoniae</u>	5
I.2 Serotipos y Serología	7
I.3 Transmisión	13
I.4 Patogénesis	14
I.4.1 Cápsula	14
I.4.2 Lipopolisacárido	17
I.4.3 Otros Factores Tóxicos	18
I.5 Signos Clínicos y Lesiones	23
I.5.1 Lesiones	24
I.6 Diagnóstico	25
I.7 Tratamiento	28
I.8 Control y Profilaxis	29
I.9 Macrófagos Alveolares	31
OBJETIVOS	40
MATERIAL Y METODOS	41
Diseño Experimental	48
RESULTADOS	50
FOTOGRAFIAS	59
DISCUSION	60
LITERATURA CITADA	68

## RESUMEN

Actinobacillus pleuropneumoniae, agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa del cerdo, posee diversos factores de virulencia, entre ellos la producción de factores solubles citotóxicos.

En el presente trabajo se hicieron estudios sobre las características de producción de los factores solubles citotóxicos para macrófagos alveolares de cerdo, secretados por los serotipos 1, 3, 5, 6 y 7 del microorganismo.

Se determinó la producción de tales factores durante las 18 hrs. primeras del cultivo in vitro de A. pleuropneumoniae. Se eligieron los sobrenadantes de cultivo de las fases: log temprana, log tardía y estacionaria temprana (aproximadamente 4, 8 y 18 hrs. del crecimiento bacteriano), determinando su citotoxicidad para monoestratos de macrófagos alveolares de cerdo (MAC).

El serotipo 1 mostró una producción más prolongada de factor(es) citotóxico(s) termolábil(es). Los serotipos 5, 6 y 7 presentaron menor efecto citotóxico termolábil y menor tiempo de producción del mismo.

La cepa del serotipo 3 de A. pleuropneumoniae, a diferencia de las cepas de los serotipos antes mencionados, expresó la producción de un factor termoestable a 56°C durante 30 minutos.

Las diferencias en secreción del(os) factor(es) termolábil(es) en los diferentes serotipos trabajados guarda relación con la virulencia que estos presentan en el campo.

Se observaron al microscopio electrónico de barrido cambios morfológicos sufridos por la membrana de los MAC, al ser expuestos a los sobrenadantes de cultivo de tal microorganismo.

## INTRODUCCION

La neumonía es uno de los problemas infecciosos más comunes y graves en el cerdo. Un porcentaje considerable de cerdos presentan lesiones neumónicas al sacrificio en rastro (Badiola y Pujols, 1984). Algunos estudios recientes demuestran que dichas lesiones probablemente subestiman el número real de casos neumónicos que ocurren en la granja (Pijoan 1985).

El gasto que ocasionan las lesiones neumónicas para la porcicultura, es elevado debido principalmente al carácter crónico que presenta con frecuencia esta enfermedad, lo cual provoca un retraso en el crecimiento por una deficiente ganancia de peso. Si a esto aunamos las pérdidas por costo de medicamentos y biológicos utilizados, así como una permanencia prolongada en corrales de finalización, el problema de costos en la producción se ve acrecentado notablemente. Esto es más pronunciado en los casos donde se presenta pleuritis, ya que se ha calculado que por cada 1% de los animales con pleuritis, hay un retraso de 1.2 días al mercado para todo el grupo. Debido a ello en los últimos años se ha incrementado la investigación sobre las causas y los efectos de las neumonías en cerdo. Aún así, hasta la fecha el conocimiento con respecto a la etiología, patogenia y control del síndrome sigue siendo limitado.

Dentro de las enfermedades causantes de problemas

del aparato respiratorio en los cerdos, se encuentran: la rinitis atrófica, la neumonía enzoótica y la pleuroneumonía contagiosa. Para el caso de rinitis atrófica se han descrito como los microorganismos causantes a Pasteurella multocida (Tipo A y Tipo D, toxigénicas) y a Bordetella bronchiseptica. Mientras que para la neumonía enzoótica la etiología es más compleja, considerandose tres etapas o estados de la enfermedad para los cuales se propone primeramente la presencia de algún virus (Adenovirus, Pseudorabia, Influenza, o Cólera) u otro agente inmunosupresor. Un segundo estadio es el que involucra la presencia de micoplasmas (M. hyoneumoniae) y finalmente la complicación bacteriana con Pasteurella multocida (Pijoan, 1985).

Con respecto a la pleuroneumonía contagiosa ó pleuroneumonía aguda, existen informes de varios países sobre brotes de la enfermedad asociados con alta mortalidad. Así mismo, se sabe que este tipo de neumonía se halla asociado con un agente bacteriano primario, Haemophilus pleuropneumoniae, que no requiere asociación con otros agentes para establecerse (Sebunya y Saunders, 1983; Yagihashi et. al.1984). También se ha descrito un síndrome de pleuroneumonía porcina debido a Pasteurella multocida (Pijoan y Fuentes, 1987), aunque estos casos parecen ser menos comunes que los ocasionados por H. pleuropneumoniae.

Las primeras observaciones sobre la pleuroneumonía por *Haemophilus*, según Leman et.al.(1986), fueron reportadas por Pattisson et.al.(1957), Matthews y Pattisson(1967), Shope (1963) y Shope et.al.(1963). Los autores observaron brotes de la enfermedad en diferentes granjas y lugares geográficos en los que se presentaba un problema respiratorio relativamente parecido a la Influenza porcina pero, que mostraba signos clínicos propios(Shope 1963; Shope et.al. 1963). La pleuroneumonía contagiosa es una de las principales enfermedades en cerdos que ocasiona grandes pérdidas a la porcicultura, el agente etiológico es *Haemophilus pleuropneumoniae* como antes se mencionó.

#### I.1 TAXONOMIA Y CARACTERISTICAS BACTERIOLOGICAS DE HAEMOPHILUS PLEUROPNEUMONIAE.

El microorganismo causante, aislado de pulmones neumónicos y capaz de reproducir la enfermedad, se clasificó inicialmente como *Haemophilus parahaemolyticus* debido a sus características bioquímicas. Posteriormente Kilian et.al. (1978), propuso el nombre de *Haemophilus pleuropneumoniae*, basandose en el hecho de que tal microorganismo presenta diferencias en cuanto a la utilización de ciertos sustratos al compararlo con la especie *parahaemolyticus*. Actualmente se ha sugerido que se reclasifique la bacteria y se le coloque den

tro del género Actinobacillus. Esta última proposición se basa en el hecho de que tanto las biovariedades factor "V" dependientes como las biovariedades factor "V" independientes de Haemophilus pleuropneumoniae, presentan una mayor similitud fenotípica y un mayor porcentaje de hibridización de DNA con Actinobacillus lignieresii que con Haemophilus influenzae. Así mismo los patrones de movilidad electroforética de las proteínas de membrana externa que presenta H. pleuropneumoniae guardan una mayor similitud con los presentados por algunas especies del género Actinobacillus como A. suis, A. equili, A. lignieresii y con Pasteurella haemolytica, que con los patrones observados para H. influenzae y H. parasuis (Pohl, et.al., 1983). Debido a esto la clasificación actual de este microorganismo es la siguiente: Actinobacillus pleuropneumoniae (cepa tipo biovariedad 1 Shope 4074 y biovariedad 2, factor "V" independiente, cepa Bertschinger 2008/76).

Sus características celulares son: cocobacilo pequeño Gram negativo, sencillo, en pares o cadenas cortas; no móvil, no forma esporas, no ácido resistente, con células que contienen dimetilmenaquinona y ubiquinona. Morfología colonial: en agar chocolate produce colonias lisas blanco-grisáceas de aproximadamente 3 mm de diámetro en 48 horas a 37°C; en agar sangre de borrego presenta una zona angosta de hemólisis beta, que se ve aumentada por la beta hemolisina del S. aureus en la prueba de CAMP. Es un mesófilo quimiorganotrófo. Requiere



de factores de crecimiento: la mayoría de las cepas son factor "V" (NAD) dependientes (Biovar. 1); algunas cepas no lo son (Biovar. 2). Ninguno de los dos biotipos requiere de factor "X" (Protohemina). Requerimientos atmosféricos: aerobio, anaerobio facultativo. Composición del DNA: cepa tipo Shope 4074, 42-43.2 mol % de G-C; cepa Bertschinger 2008/76, 42.2 mol % de G-C. Patogenicidad: la morbilidad causada por la biovar 2 es menor que la causada por la biovar 1.

Las características bioquímicas de este microorganismo se muestran en el cuadro I.1 (Pohl et.al., 1983).

## I.2 SEROTIPOS Y SEROLOGIA.

Actinobacillus pleuropneumoniae presenta múltiples antígenos especie-específicos, mientras que para el caso de los antígenos tipo-específicos se han observado solamente de 2 a 4 componentes. Por lo general los antígenos que proporcionan la especificidad de tipo en las bacterias se encuentran localizados en la superficie de éstas.

Nicolet (1971), utilizó pruebas de aglutinación y la prueba de Quellung (hinchamiento de cápsula), para definir tres serotipos de A. pleuropneumoniae, basándose en los antígenos tipo-específicos asociados a cápsula. Gunnarsson et. al. (1978), amplió a cuatro y cinco serotipos y Nielsen y O'Connors (1984) y Nielsen (1985 ab y 1986), propusieron el

Cuadro I.1. Actividad Bioquímica (Pohl et.al., 1983).

Características	A.l.	H.p.	Org. BS	P.h.	H.i.
Adherencia colonial	v	v	-	-	-
Hemólisis	-	+	d	+	-
Oxidasa TMPD	+	+	+	+	-
Catalasa	-	-	-	+	+
Req. de NAD	-	+	-	-	+
Req. de Hemina	-	-	-	-	+
Crec. en MacConkey	+, (+)	-	v, (d)	+	-
Prod. de Ubiquinona	+	+	d	+	-
Indol	-	-	-	-	+
Ureasa	+	+	+	-	+
Acido a partir de:					
D(+)-Galactosa	+	d	(+)	(+)	+
D(-)-Fructosa	+	+	+	+	-
D(+)-Mannosa	+	+	+	-	-
L(+)-Arabinosa	-	-	-	(v,d)	-
D(+)-Xilosa	+	+	+	+	(+)
Rafinosa	-	-	-	(+)	-
D(+)-Lactosa	(+)	-	(+)	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	-
Maltosa	+	+	+	+	-
D(-)-Manitol	+	+	+	+	-
Sorbitol	-	-	-	+	-
B-Galactosidasa	+	+	+	-	-

v=variable; d= débil.

A.l. = Actinobacillus lignieresii.

H.p. = Haemophilus pleuropneumoniae.

Org. BS = Organismos Bertschinger y Seifert (Semejantes a H.p, excepto en req, de NAD).

P.h. = Pasteurella haemolytica.

H.i. = Haemophilus influenzae.

octavo, noveno, décimo y doceavo serotipos. Mientras que Rosendal y Boyd (1982), caracterizaron el sexto y séptimo.

Nicolet (1971), describió antígenos tipo-específicos tanto de naturaleza termolábil (TL) como termoestables (TS) y reportó que los antígenos especie-específicos están formados por ambos tipos de componentes, estos componentes son los responsables de las reacciones serológicas cruzadas entre constituyentes celulares heterotípicos.

Para H. influenzae, los antígenos tipo-específicos ya han sido descritos como polisacáridos (PS). En el caso de A. pleuropneumoniae, Gunnarsson (1979), consideró que debido a que la especificidad de tipo puede conservarse en la fase acuosa de una extracción agua-fenol, es probable que los antígenos tipo-específicos sean PS y/o LPS (lipopolisacáridos). Esto parece reafirmarse con la posibilidad del uso de la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA), dado que según Gunnarsson (1979), Keog (1948) menciona que en la mayoría de los casos los antígenos o principios activos que sensibilizan eritrocitos son PS.

Se han observado reacciones serológicas cruzadas in vitro, entre los diversos serotipos de A. pleuropneumoniae, lo cual es probablemente debido a que posee más de un componente antigénico tipo-específico. De esta manera, la expresión variable de estos antígenos ha permitido observar, por ejemplo: reacciones cruzadas entre los serotipos 6 y 8

en pruebas de IHA; entre los serotipos 3 y 8 en pruebas de inmunodifusión doble,IDD (Nielsen y O'Connors, 1984; Lariviere et.al., 1987); de serotipos 4 y 5 con el 6 (Rosendal y Boyd, 1982) en pruebas de inmunofluorescencia. Con esta última prueba Rapp et. al. (1985b), encontró cruzamientos serológicos del serotipo 4 con el 5 y el 7; y del serotipo 2 con el 6.

En cuanto a las posibles reacciones serológicas entre A. pleuropneumoniae y otras especies o subespecies del género Haemophilus u otros géneros, sólo se ha reportado reacción cruzada entre el serotipo 2 de A. pleuropneumoniae con la cepa 202 de Haemophilus Taxon Minor, Rapp et. al.(1985a). Aunque anteriormente se consideraba que no existía ninguna reacción serológica cruzada entre A. pleuropneumoniae y H. parasuis recientemente Nicolet(1985), observó una relativa heterogeneidad serológica entre cepas de H. parasuis, y Rapp et.al.(1985a), encontró anticuerpos contra A. pleuropneumoniae serotipo 5, en cerdos de los cuales se aisló una bacteria semejante a H. parasuis.

Rosendal y Mittal (1985), también encontraron anticuerpos contra A. pleuropneumoniae, en cerdos infectados natural y experimentalmente con cepas de Actinobacillus spp. Todo parece indicar que en los estudios serológicos con este microorganismo se debe considerar la posibilidad de que se produzcan reacciones falsas positivas.

El perfil proteico de la membrana externa, obtenido por electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS, resulta útil como marcador morfológico, epidemiológico y de virulencia para algunos patógenos Gram negativos. Se han determinado siete patrones, basados en la movilidad electroforética de las proteínas de la membrana externa en nueve serotipos capsulares de A. pleuropneumoniae. Estas proteínas están localizadas principalmente en la región de pesos moleculares (PM) de 39 a 44 y de 16-16.5 kd; así como una proteína modificable por calor, de aproximadamente 29 kd.

Las cepas de los serotipos 1 y 9 muestran perfiles proteicos similares entre sí (Patrón I); lo mismo ocurrió con las cepas correspondientes a los serotipos 2 y 6 (Patrón II). Los restantes serotipos no muestran tanta similitud entre sí y al serotipo 3 le correspondió el denominado Patrón III, al serotipo 4 el Patrón IV, al serotipo 5 el Patrón V, al serotipo 7 el Patrón VI y finalmente al serotipo 8 el Patrón VII (Rapp et al., 1986a; Rapp y Ross 1986b).

También McInnes y Rosendal (1987), trabajaron con patrones electroforéticos de las proteínas de membrana externa y proteínas totales de la bacteria de los serotipos 1 al 8. Estos autores encontraron que todos los serotipos comparten proteínas que migran a 17, 32 y 42 kd. La banda de 17 kd se presenta también en otras bacterias Gram negativas y la 32 kd aparece también en bacterias del género *Actinobacillus* (suis);

en cambio, la banda de 42 kd parece corresponder solamente a A. pleuropneumoniae. Los autores observaron también ciertas diferencias en los patrones de proteínas totales en diferentes cepas del mismo serotipo. Musser et.al. (1987), realizaron un estudio con 135 cepas de diversos orígenes geográficos, colectadas durante diferentes años, para observar la relación de variación alélica de los genes estructurales de algunas enzimas que produce A. pleuropneumoniae. Los autores consideran que este microorganismo presenta una estructura poblacional de tipo clonal. Observaron además que existe relación entre la presentación de los patrones de movilidad electrofóretica de las enzimas con los patrones de movilidad electrofóretica de las proteínas de la membrana externa; estas relaciones también coinciden con el tipo serológico de las cepas. Así mismo, observaron que las cepas poco patógenas del serotipo 1 se relacionan clonalmente con las del tipo 9.

Rosendal et.al. (1985), mencionan que el serotipo 3 es menos virulento, que los serotipos 1, 2 y 7. En cambio, entre estos tres últimos serotipos no observaron diferencias marcadas, aunque el serotipo 2 es ligeramente menos virulento que el serotipo 1, cuando se inocula experimentalmente en cerdos.

### I.3 TRANSMISION

A. pleuropneumoniae penetra en el cerdo por vía respiratoria (Leman et. al., 1986) y se transmite principalmente por el contacto directo de cerdo a cerdo, debido a la proximidad entre animales dentro de la granja. En el caso de brotes agudos se ha observado que la infección se presenta aún en animales de diferentes corrales, lo que sugiere la posible participación de aerosoles como forma de transmisión indirecta dentro de la granja (Nicolet, 1985), pero esta hipótesis no se ha demostrado.

Se considera que la forma más común de introducción de la enfermedad a una granja susceptible, se produce cuando se introducen animales infectados.

Los animales de todas las edades son susceptibles cuando no han tenido contacto previo con el microorganismo, sin embargo los cerdos de 10 a 12 semanas y los de finalización son los más comunmente afectados en granjas con historia previa de infección.

Algunos factores que afectan son: la alta densidad de población, la convivencia de animales de distinto origen, factores climatológicos adversos (temperaturas variables y corrientes de aire frío), cambios en el manejo y malas condiciones de higiene, son elementos que favorecen la presentación de un brote de la enfermedad.

## I.4 PATOGENESIS

Se sugiere que la enfermedad se presenta cuando el microorganismo escapa de los mecanismos de defensa del tracto respiratorio superior y llega a nivel alveolar en donde, dependiendo de la habilidad del A. pleuropneumoniae involucrado (factores de virulencia) y de la falta de una respuesta inmune adecuada por parte del hospedero podrá establecerse y multiplicarse (Leman et.al.,1986).

A. pleuropneumoniae se ha caracterizado por su gran patogenicidad debido probablemente a la combinación de los diversos factores de virulencia que posee, como: la presencia de cápsula, endotoxina, exotoxina(s) y enzimas con actividad de proteasa sobre IgA (Rapp, 1987).

En general, se considera que la cápsula bacteriana puede facilitar la colonización y conferir cierta protección al microorganismo contra factores inmunológicos del huésped, como el complemento y los anticuerpos (Rapp, 1987).

### I.4.1 CAPSULA

En el caso de otros microorganismos se ha observado que la presencia de la cápsula se halla asociada a la virulencia. Por ejemplo, las cepas capsuladas de H. paragallinarum resultan patógenas para los pollos mientras que las



cepas no capsuladas no producen ninguna afección en dichos animales.

La composición de la cápsula, parece influir también en la virulencia del microorganismo, tal es el caso de H. influenzae del cual se sabe, que las cepas que poseen el denominado tipo capsular "b" son las más virulentas,

En cuanto a la cápsula de A. pleuropneumoniae, se reportó que esta bacteria posee un material capsular compuesto principalmente de carbohidratos (97,3% en peso), que no es dializable y no precipita con acetona, ni coagula al ser calentada a 100°C durante 30 min. Parece no presentar proteínas detectables en su composición y sólo trazas de KDO (ác. 3 deoxi-D-manno-2-octulosónico). Presentó además hexosas y trazas de lípidos (Fenwick et.al., 1986b; Jensen y Bertram, 1986).

Jensen y Bertram (1986), informaron de algunas diferencias en la morfología y características de la cápsula entre dos cepas: una virulenta y una avirulenta de A. pleuropneumoniae, serotipo 5. Al observar ambas cepas al microscopio electrónico, encontraron que con tinción de rojo de rutanio sólo se veía material capsular en la cepa virulenta y con tinción de ácido fosfotúngstico el material capsular de esta cepa era de mayor grosor y con más ondulaciones que la de la cepa avirulenta. Así mismo, se notó un fácil desprendimiento del material capsular en la cepa no virulenta al

lavar las bacterias con buffer o con agua. Por otro lado, la cepa virulenta retuvo la cápsula con el mismo tipo de lavados. Estos autores consideran que las diferencias en la estructura capsular de A. pleuropneumoniae pueden estar relacionadas con la virulencia, considerando que mientras la cepa virulenta posee una cápsula adherente al cuerpo bacteriano, la cepa no virulenta la pierde fácilmente. Las diferencias en la estructura capsular reflejaron variaciones en los componentes de su superficie debidas posiblemente a diferentes niveles de estructura terciaria (Jensen y Bertram, 1986). La interacción de la cápsula con la estructura terciaria del polisacarido somático del LPS, puede estar involucrada en la unión de la cápsula a la pared celular de la bacteria,

Inzana y Mathison (1987), también consideraron que los antígenos capsulares solubles en agua son los que retienen la mayor especificidad de tipo. Estos autores encontraron que el polisacarido capsular puro del serotipo 5, es menos antigénico, al ser inoculado en cerdos o en conejos, que las bacterias completas. Sin embargo, los anticuerpos producidos contra la bacteria completa del serotipo homólogo, reaccionaron bien contra este polisacarido capsular purificado. Además no observaron reacciones cruzadas con sueros heterotípicos. Esta fracción de PS es estable al calor (100°C/30 min) y al enfrentarse en prueba de inmunodifusión doble contra el suero homólogo sólo se observó una línea de precipitación (Inzana, 1987).

#### I.4.2 LIPOPOLISACARIDO (LPS)

En el aislamiento del LPS de A. pleuropneumoniae, se han empleado técnicas de extracción con agua y con solventes menos polares o no polares como el fenol, cloroformo y éter del petróleo. De esta manera se han obtenido fracciones solubles y fracciones insolubles en el agua. Estas extracciones han permitido la caracterización parcial del contenido del LPS (Fenwick et.al.,1986b). Así se sabe que este microorganismo presenta dentro de la composición de su LPS algunos carbohidratos como: ramnosa, manosa, galactosa, glucosa, heptosa; así como glucosamina, galactosamina, y KDO. También se encontraron algunos ácidos grasos de 14 y 16 carbonos (Maudsley et.al.,1986). Por otra parte Jensen y Bertram (1986), reportaron que contiene entre 30 y 37% de lípido A,

Los mismos autores informan que en dos cepas del serotipo 5 de A. pleuropneumoniae estudiadas (virulenta y avirulenta) de las cuales se aisló el LPS, observaron notables diferencias en cuanto a las concentraciones de galactosa. La cepa virulenta mostraba 13 veces más galactosa que la cepa avirulenta y un mayor porcentaje de KDO, pero un menor porcentaje de heptosa y lípido A (Jensen y Bertram,1986).

El LPS de A. pleuropneumoniae muestra actividad endotóxica mediante la prueba de formación del gel con LAL (Lisado del amebocito de *Limulus polyphemus*), Además es capaz

de producir una lesión dérmica de tipo Schwartzman positiva en conejo y en cerdo al inocularse intradérmicamente(ID). Cuando se inocula por vía intravenosa (IV) produce reacción febril difásica en conejos y monofásica en cerdos. En embrión de pollo se ha estimado una dosis letal media de 1,6-7,3 ng. La aplicación intratraqueal de endotoxina en cerdos, produjo lesiones pulmonares típicas, similares a las encontradas en cerdos que mueren por la fase aguda de la pleuroneumonía por este microorganismo. Esto sugiere un papel importante de la toxina en la patogenia de la enfermedad (Fenwick et.al., 1986b). Los efectos biológicos antes mencionados para el LPS de A. pleuropneumoniae son similares a los efectos producidos por los LPS de H. influenzae y E. coli (Maudsley et.al., 1986).

#### I.4.3 OTROS FACTORES TOXICOS

En cuanto a la posible producción de factores tóxicos por A. pleuropneumoniae, Rosendal et.al. (1980), reportó que los sobrenadantes libres de bacterias, al ser administrados endobronquialmente en cerdos, producían lesiones hemorrágicas pulmonares, similares a las producidas por la infección natural. A partir de entonces se han presentado diversos reportes a cerca de la actividad tóxica que muestra el sobrenadante de cultivo de esta bacteria, sobre diferentes sistemas.

Bendixen et.al. (1981), encontraron que los filtrados de cultivo de A. pleuropneumoniae resultaban tóxicos para los macrófagos alveolares y para los monocitos de sangre periférica del cerdo y que la exposición al calor (100°C durante 15 min.) no alteraba dicha toxicidad. Por otro lado el suero de animales que sufrían la forma crónica de la enfermedad, era capaz de neutralizarla.

Boyd y Rosendal (1985), informaron más tarde la obtención de fracciones de bajo peso molecular (PM 10-20 mil daltones) del sobrenadante de cultivo dializado y fraccionado, a través de Sephacril 200 y DEAE de intercambio iónico. Dichas fracciones tenían actividad tóxica para monocitos de sangre periférica; tal toxicidad se veía afectada al exponer las fracciones a 120°C durante 10 min., pero no parecía dañarlas un calentamiento de 60°C/60 min. También resultó sensible a proteasas y tripsina, y notaron que dependiendo del tiempo de cosecha del sobrenadante la toxicidad decrecía en forma proporcional; a mayor tiempo de cultivo menor toxicidad.

Nakai et.al. (1984), utilizando el filtrado crudo así como una fracción obtenida en gradientes de sacarosa, encontraron que estos filtrados poseían actividad hemolítica sobre glóbulos rojos de equino. Estos filtrados no mostraban actividad endotóxica y eran capaces de provocar la muerte en 12 horas a lechones y cuyes a los que se les inoculaba intratraquealmente. En estos animales la fracción produjo lesio-

nes pulmonares similares a las encontradas en los animales infectados naturalmente por *Actinobacillus*. La capacidad tóxica resultó ser estable al calor, 121°C durante 2 hrs. Al probar estas fracciones sobre macrófagos alveolares, monocitos de sangre periférica y macrófagos peritoneales de cerdo, se presentó una marcada citotoxicidad sobre estas células, principalmente sobre macrófagos alveolares. En los macrófagos sobrevivientes se observó disminución en la actividad fagocítica. Los efectos citotóxicos mostraron ser dependientes de la dosis y del tiempo de exposición. Así mismo, se observó cierta correlación entre la actividad hemolítica y la citotóxica. La tinción de las bandas obtenidas del filtrado por electroforesis, parecen indicar que la fracción estaba compuesta principalmente por carbohidratos y en menor proporción por proteínas (Kume et, al., 1986).

Trumper y Joens (1984), informaron que una fracción obtenida por cromatografía a partir del sobrenadante de 48 horas, causó la muerte a ratones CF-1, al ser inoculada intraperitonealmente (IP). Dicha fracción no poseía actividad hemolítica, era resistente al calor y proteasa, pero sensible a urea y peryodato, con un PM probable de 200 mil daltones.

Pijoan (1986), al probar el sobrenadante de diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae* en macrófagos alveolares de cerdo encontró variaciones en la actividad citotóxi

ca dependiendo del serotipo involucrado.

Aún no hay una adecuada explicación de la patogenicidad de la pleuroneumonía, pero el tipo de lesiones que se presentan y que incluyen edema, hemorragias e infartos, sugiere que la vasculatura pulmonar puede ser un blanco temprano en el curso de la enfermedad. La causa del daño vascular puede atribuirse a mecanismos diferentes. El principal de estos parece ser la producción de sustancias extracelulares termoestables con actividad endotóxica, que podrían activar el complemento y/o los mecanismos de la coagulación. Sumado a esto, puede presentarse lesión por causa de una reacción localizada de hipersensibilidad tipo III (Fenómeno de Arthus), con la acción del complemento por sistemas inmunes solubles de antígeno-anticuerpo.

Debe considerarse además el ya citado efecto citotóxico de las fracciones termosensibles sobre macrófagos alveolares. En estos se disminuye incluso la capacidad fagocítica de las células sobrevivientes, causando con ello un daño directo a la principal defensa celular del pulmón. Las observaciones in vitro del efecto sobre los macrófagos alveolares, pueden explicar parcialmente los notables cambios observados en estas células en el pulmón de cerdos infectados.

Trumper (1985), utilizando ratones C3HeB/FeJ sensibles a endotoxina, y células CHO que sufren efecto citopático en presencia de endotoxinas, comunicó la posible existencia

cia de dos factores tóxicos diferentes: una toxina termoestable que se expresa en los sobrenadantes de 48 hrs. de cultivo bacteriano in vitro, y una segunda toxina termosensible que se expresa en los sobrenadantes de cultivo de 8 horas; señalando que la toxicidad temprana (8 horas), es debida principalmente a una exotoxina, mientras que la toxicidad tardía (48 horas) parece ser debida a una endotoxina. El autor considera que la toxina de 48 horas (fase log estacionaria tardía) puede ser debida al LPS o a una glicoproteína o bien a un complejo formado por ambos componentes; mientras que el factor tóxico presente en el sobrenadante de 8 hrs. es probablemente de naturaleza proteica.

Este mismo autor, comentó que las condiciones de cultivo, incluyendo el medio de cultivo utilizado para crecer la bacteria influyen en la producción de los factores tóxicos.

Recientemente Ligget et.al, (1987), propusieron que parte del daño sufrido por el tejido pulmonar pueda deberse a la liberación de enzimas y sustancias tóxicas a partir de neutrófilos que aparecen en la zona afectada en las primeras horas de la infección por A. pleuropneumoniae.

Con respecto a la producción de enzimas con actividad de proteasa sobre IgA porcina, aún existe desacuerdo. Kilian et.al. (1978), comunicó que A. pleuropneumoniae era capaz de producir esta enzima; sin embargo, Mulks et.al.



(1984), no encontró tal actividad en ningún serotipo de la bacteria, ni tampoco secuencias en su DNA que presenten homología con el gen de H. influenzae que parece codificar para la producción de tales proteasas.

## I.5 SIGNOS CLINICOS Y LESIONES

La enfermedad se puede presentar en forma hiperaguda, aguda, subaguda o crónica, dependiendo del grado de inmunidad de los animales hacia A. pleuropneumoniae, de su estado general y de las condiciones de manejo.

La muerte de algunos animales en la granja, es el primer elemento que hace evidente el problema (Didier et.al, 1984). Los primeros signos que presentan los cerdos y que pocas veces se perciben son: reñencia al movimiento, respiración ligera o poco profunda y un ligero aumento en la temperatura (41,1 a 41,7°C). Conforme la infección avanza, los animales muestran postración, descansando sobre los cuartos traseros contra las paredes; presentan además cianosis, epistaxis, respiración por la boca y finalmente algunos de ellos mueren (Henry et.al., 1982).

La morbilidad es alta (70% aprox.) y la mortalidad variable entre 1 a 30%. En los brotes agudos el curso de la enfermedad en la granja es rápido, de una a dos semanas. Los animales que no mueren pueden pasar a la forma sub

aguda o la crónica, una vez que los signos de la forma aguda han desaparecido. En los animales se observa apetito disminuido, lo cual provocará de forma consecuente una disminución en la ganancia de peso (Stone, 1984; Nicolet, 1985).

#### 1.5.1 LESIONES

Las lesiones se localizan principalmente en el tracto respiratorio. A la necropsia los animales muestran neumonía lobar extensa predominantemente basal y/o diafragmática con pleuritis fibrinosa y zonas edematosas. Por lo general la neumonía es bilateral, involucrando los lóbulos cardíaco y apical, así como parte del diafragmático.

Las zonas neumónicas presentan un color rojo púrpura obscuro, son friables (forma hiperaguda), en ocasiones granulares (forma aguda y subaguda). Se observa un fluido sanguinolento gelatinoso en los septos interlobulares y fibrina adherente con exudado amarillento sobre las áreas neumónicas a nivel pleural y subpleural. La presencia de lesiones primarias en la parte dorsal de los lóbulos basales parece ser característico de las neumonías por A. pleuropneumoniae (Shope, 1963; Nicolet, 1985). Los bronquios y la tráquea contienen un fluido espumoso sanguinolento (Shope, 1963; Didier et al., 1984). En algunas ocasiones se llegan a observar depósitos de fibrina en la cavidad abdominal y articula-

ciones. En casos crónicos se observan nódulos de diferentes tamaños que principalmente se localizan en los lóbulos diafragmáticos (Nordstoga, 1967; Nicolet, 1985).

La histología evidencia bronconeumonía exudativa, descamativa y proliferativa con pleuritis fibrinosa y tendencia al encapsamiento en los casos crónicos. Así mismo, hay congestión severa con vasculitis multifocal y trombosis de los vasos sanguíneos y linfáticos. Los alveolos contienen exudado de células mononucleares principalmente macrófagos, linfocitos, células grandes transformadas, células alveolares descamadas, junto con fibrina, hemorragia y cocos bacilos. Un exudado similar se observa en los septos interlobulares y sobre la pleura visceral (Shope, 1963).

## I,6 DIAGNOSTICO

El diagnóstico presuntivo de la pleuroneumonía puede darse en base a los signos observados en la forma aguda, más las lesiones del examen posmortem, la confirmación del diagnóstico resulta del aislamiento del microorganismo causante (Nicolet, 1985). En el examen posmortem las lesiones pulmonares descritas anteriormente, junto con la pleuritis, resultan sumamente características, casi patognomónicas (Stone, 1984; Nicolet, 1985).

Aislamiento: el aislamiento y la caracterización

del A. pleuropneumoniae, es necesario para excluir a cualquier otro agente como probable causa de neumonía. El aislamiento primario a partir del exudado bronquial, nasal y en particular de las lesiones neumónicas, se realiza eficientemente por el método de diluciones en líquido, reportado por Pijoan et.al. (1983), posteriormente se siembra en agar sangre de borrego al 5 %, con S. epidermidis como cepa nodriza (fenómeno de satelitismo), para cubrir el requerimiento de NAD. El satelitismo junto con la hemólisis beta provee un diagnóstico bacteriológico indicativo. La identificación bacteriológica total se realiza mediante las pruebas bioquímicas resumidas en la Tabla I,1

Las pruebas serológicas tales como aglutinación en placa, aglutinación en tubo, formación del anillo de precipitación y la inmunodifusión doble, permiten identificar el serotipo de Actinobacillus involucrado (Mittal et.al. 1982).

Mittal et.al. (1983), reportaron el uso de la prueba de coaglutinación, en la que detectan antígenos tipo-específicos de A. pleuropneumoniae a partir de macerados del tejido infectado. Esta prueba se utiliza ya en forma rutinaria en varios laboratorios de diagnóstico.

Las pruebas serológicas se utilizan en la detección de portadores y con este propósito se han empleado pruebas como la fijación del complemento (Lombin et.al.,1981), la aglutinación en tubo. ELISA y recientemente la prueba de

aglutinación con 2-Mercaptoetanol (Mittal et.al.,1984). Las pruebas serológicas constituyen una herramienta valiosa en el manejo del problema infeccioso en la granja, pues permiten detectar a los animales enfermos crónica y subclínicamente. Esto permite eliminar a las posibles fuentes de infección, para los animales sanos. De la misma manera se puede evitar la introducción de cerdos portadores a granjas libres de la enfermedad, reduciendo la probabilidad de que se presenten los brotes agudos en animales sin inmunidad previa.

Sin embargo, para todas esas pruebas se recomienda la evaluación individual de un buen número de animales dentro de la granja y hacer la interpretación de los resultados en base a la epidemiología de la granja y no por individuo. (Mittal et,al,,1984; Nielsen,1985c).

Puede decirse que actualmente la prueba de 2-Mercaptoetanol es la que proporciona mayor sensibilidad y más alta especificidad para el diagnóstico serológico de granjas, pues su realización es más fácil y barata que las pruebas de ELISA o FC (Mittal et,al,,1984). Sin embargo se presentan problemas de especificidad sobre todo con cerdos adultos. Nielsen (1987), sugiere el uso de la prueba de IHA, pues los anticuerpos que producen los cerdos por la vacunación no se detectan por esta prueba, pero si los anticuerpos que aparecen como resultado de una infección,

Los títulos presentados por la prueba de FC, no parecen correlacionar bien con la verdadera inmunidad del animal, pues aún en animales que presentan un bajo título de anticuerpos, posterior a una exposición bajo condiciones experimentales, se presenta protección ante el reto con bacterias de serotipo homólogo (Rapp et.al.,1985a).

#### I.7 TRATAMIENTO

Tan pronto se presenta un brote se debe comenzar un tratamiento por vía oral y parenteral. Se ha observado que esta combinación proporciona buenos resultados, al presentar una buena absorción y una alta concentración del medicamento en el tejido pulmonar, favoreciendo la resolución del cuadro hasta la curación. El medicamento a usar deberá elegirse en función de los antecedentes epidemiológicos que orienten sobre la susceptibilidad actual de las cepas regionales y con la elaboración de un antibiograma a las cepas involucradas en el brote en estudio. En términos generales, se ha recomendado el tratamiento con inyectables, y no con medicamentos orales. Dentro de los inyectables los más eficientes parecen ser penicilina y la mezcla de lincomicina con espectinomina. Recientemente, en E.U.A. y en México, se ha autorizado el uso de tiamulina en forma oral.

## I.8 CONTROL Y PROFILAXIS

Para el control y la prevención de la pleuroneumonía contagiosa deben tomarse en cuenta varios factores, entre ellos la inmunidad de la granja.

Se ha observado que los animales que sobreviven después de un brote natural por A. pleuropneumoniae, desarrollan inmunidad especie-específica ante el microorganismo y adquieren resistencia a la enfermedad. De esta forma la granja adquiere cierto grado de inmunidad de población.

Las cerdas que han sido expuestas proporcionan a sus lechones inmunidad pasiva que los mantiene protegidos durante las primeras 3 a 4 semanas de vida. Debido a esto se pueden observar brotes en grupos de lechones de entre 3 a 6 semanas de edad. Quizás es en la unidad de engorda en donde se presentan con más frecuencia los brotes agudos, debido al mezclado de animales no inmunes con animales infectados crónicamente que actúan como portadores. A este nivel es difícil el establecimiento de inmunidad del grupo debido principalmente al continuo movimiento de cerdos con introducción de nuevos animales (Pijoan et al., 1985).

El serodiagnóstico proporciona la manera de localizar a los animales crónicamente enfermos; la exclusión de tales animales portadores, con la introducción de animales seronegativos que se sometan a cuarentena y a los cuales se

les realice un par de pruebas serológicas con intervalos de aproximadamente tres semanas, puede resultar en un factor de control importante (Nielsen, 1985c).

La vacunación que se ofrece hoy en día previene la mortalidad pero no evita la aparición de la forma crónica de la enfermedad ni de portadores. El uso de bacterinas que contienen además de la bacteria involucrada, LPS de alguna enterobacteria como E. coli (cepa J-5) han mostrado prevenir o disminuir la mortalidad en buen grado (Fenwick et.al., 1986abef).

La introducción de inmunógenos a base de fracciones (cápsula, endotoxinas o exotoxinas) acompañados de adyuvantes emulsionados (aceite en agua), podrán en un futuro proporcionar mejores resultados en la prevención de la enfermedad (Rapp, 1987).

Por otra parte, el manejo en la granja es de suma importancia en el control de la neumonía; 1) Evitando áreas o unidades con sobrepoblación, 2) Disminuyendo el mezclado de animales y 3) Tratando de implementar un método controlado de movimiento de animales de "todo dentro-todo fuera". El uso de bardas de concreto sólidas, que no permitan un contacto directo entre animales de corrales vecinos, y un ambiente con higiene, temperatura y humedad adecuados en la explotación, coadyuvará a mejorar el control de las neumonías (Pi Joan, 1985).



## I.9 MACROFAGOS ALVEOLARES

Los macrófagos alveolares están comprendidos dentro de las células que forman el sistema de fagocitos mononucleares, el cual comprende a los macrófagos de los diversos órganos y tejidos corporales, así como a los monocitos circulantes y sus precursores: promonocitos y monoblastos localizados en la médula ósea (Furth van, 1985). Este grupo de células se originan a partir de una célula germinal en médula ósea. La célula más inmadura de la línea es el monoblasto, que se divide para dar dos promonocitos, cada uno de los cuales a su vez da origen a dos monocitos que sin dividirse pasan a la circulación, de donde después de cierto tiempo pasan a los tejidos, donde pueden ser reconocidos primeramente como macrófagos exudativos (células con características similares a los monocitos). En los tejidos pueden sufrir ciertos cambios en algunas de sus características, como la reducción en el número de gránulos de peroxidasa positivos y la reaparición de la actividad de peroxidasa en el retículo endoplásmico rugoso y en la membrana nuclear. Una vez completados estos cambios, las células pasan a considerarse como macrófagos exudativo-residentes, para finalmente adquirir todas las características de un macrófago residente, considerando particularmente su actividad de estearasa (Diedelhoff-den Dulk y Furth van, 1981; Furth van, 1985).

Los macrófagos alveolares son células residentes de los alveolos, se localizan principalmente en el lumen alveolar sobre el epitelio, en los fluidos del revestimiento alveolar que contienen el surfactante y proteínas plasmáticas solubles, entre las que se encuentran inmunoglobulinas. Los macrófagos alveolares se encuentran en una situación única en el sistema con respecto al resto de los macrófagos, pues se hallan expuestos directamente a un medio ambiente hiperoxigenado y en contacto íntimo con materiales aerógenos y sanguíneos.

#### Funciones.

Las funciones de los macrófagos alveolares comprenden tres aspectos principales:

1.- Remoción. Esta ha sido la función más estudiada de los macrófagos e involucra tanto su migración como la actividad fagocítica en sus distintas fases, reconocimiento de lo extraño, unión a la membrana celular del microorganismo u objeto a fagocitar, ingestión y digestión.

Aunque la función principal de los fagocitos monocelulares sea la eliminación del material extraño por endocitosis, el número de macrófagos que se encuentran generalmente en los tejidos normales o durante la fase inicial de una reacción inflamatoria, es mucho menor del "necesario" para la eliminación efectiva del agente extraño. Por esto la migración de monocitos circulantes hacia los tejidos afectados ayuda a la eliminación del agente inflamatorio y del

tejido necrótico, contribuyendo así a la restauración de los tejidos. Al igual que en el caso de otros macrófagos, la migración de los macrófagos alveolares depende de factores quimiotácticos que pueden generarse en la respuesta inflamatoria alveolar, a partir de factores séricos como algunos componentes del complemento y sustancias derivadas de microorganismos (Mc Lennan y De Young, 1984).

Además de los granulocitos y monocitos (macrófagos exudativos) que migran en el exudado inflamatorio, también se encuentran proteínas plasmáticas (inmunoglobulinas y factores del complemento) que pasan a través de la pared vascular. La activación del complemento ocurre localmente y los factores resultantes participan en el proceso de quimiotaxis y opsonización. Las opsoninas incluyen moléculas y complejos como: IgG, C3b, IgG-C3b, o IgM-C3b, que se adhieren a las partículas extrañas. Los macrófagos presentan receptores de membrana para C3b y Fc(IgG). Para una ingestión óptima la partícula extraña debe estar cubierta con las opsoninas para las cuales existan receptores específicos (Fc y C3b) en la membrana del fagocito que le permitan interactuar con tales opsoninas fijando la partícula y facilitando su ingestión mediante la formación de pseudópodos por la célula. Así mismo, para una óptima lisis intracelular del microorganismo, se requiere de la interacción entre proteínas plasmáticas (IgG, C3/C3b, B/Bb) y los receptores de la

membrana. La ingestión de partículas por fagocitos es seguida de la fusión fagosoma-lisosoma, lo que permite el contacto de las enzimas líticas lisosomales con la partícula ingerida, en ciertos casos los macrófagos son "activados" por factores como las linfocinas y el interferón producidos por los linfocitos T. Estos factores determinan que el macrófago tenga mayor eficiencia bactericida y pueda degradar el material ingerido (Reynolds et,al.,1975; Pennington et,al., 1983; Furth van,1985 ; Charley y Frenove 1980).

2.- Modulación de la respuesta inmune. El macrófago participa dentro de la modulación de la respuesta inmune con la producción de monocinas, entre las que se encuentra la interleucina 1.

3.- Modulación del tejido adyacente diferente del sistema inmune, incluyendo la citotoxicidad directa.

Esta tercera función de los macrófagos describe la habilidad que estos poseen para modificar el tejido que los rodea y que no pertenece al sistema inmune. Los macrófagos alveolares, como otros macrófagos residentes, poseen varios receptores de superficie que les permiten responder a una amplia variedad de mensajes químicos del medio ambiente inmediato. Presentan la capacidad de secretar sustancias (lisosima, elastasa, colagenasa) que, si bien pueden aumentar el daño pulmonar, también pueden jugar un posible papel protector. Producen factores quimiotácticos para PMN, además

de radicales superóxido (anión), peróxido de hidrógeno y radicales oxhidrilo, que también pueden eventualmente dañar al tejido pulmonar cercano. Finalmente, entre otras sustancias que producen y liberan los macrófagos, se encuentran factores que modulan la proliferación de fibroblastos (McLennan y De Young, 1984),

El estudio de los macrófagos alveolares se ha incrementado en años recientes debido principalmente al reconocimiento de su importante papel en la defensa inmunológica del pulmón y a la facilidad para obtenerlos en población casi pura para su estudio inmediato o en cultivo.

#### Obtención.

Myryik et, al. (1961), fue el primero en describir la obtención de los macrófagos alveolares de conejo por medio de lavados traqueobronquiales, siendo hoy día el método más empleado, con algunas modificaciones. Así mismo, se pueden obtener estos macrófagos a partir de extracciones acuosas de fragmentos pulmonares.

El lavado traqueobronquial se realiza mediante la instilación de fluido dentro de los pulmones a través de los conductos aéreos con la posterior extracción por succión. Del fluido recuperado se obtienen principalmente macrófagos (80 a 95%) y en mucho menor número linfocitos y granulocitos (Senior et, al., 1981; Mayer y Lam, 1984; Pi Joan, 1985; Zeidler y Kim, 1985).

El número de macrófagos que se recupera en el lavado está influenciado por la composición y temperatura del fluido con el que se haga el lavado, y del masaje o la falta de éste que se dé a los pulmones al estar lavando. La solución salina fisiológica (SSF) o el buffer de fosfatos salino (PBS) son soluciones acuosas adecuadas para la realización de dicho lavado, favoreciéndose la viabilidad de las células si se usan estas soluciones a 4°C.

Para el mantenimiento in vitro de los fagocitos mononucleares no se requieren condiciones muy complejas. El uso de medios de cultivo celular básicos como MEM-Dulbecco, MEM-Eagle y RPMI-1640 suplementados con sueros (10% v/v) suelen ser suficientes, utilizando además algún sistema buffer para controlar el pH de cultivo como CO<sub>2</sub>-Bicarbonato o buffer HEPES. Los sueros comúnmente utilizados son: suero fetal bovino (SFB), suero neonatal bovino y suero de equino (Senior et.al.,1981; Adams y Edelson,1981).

En general los cultivos de fagocitos mononucleares se mantienen mejor cuando el monoestrato no es ni confluyente ni escaso, es decir que posee una población media de aproximadamente  $2-3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> (Senior et.al.,1981; Mayer y Lam,1984).

Los macrófagos, en terminos generales, presentan una morfología característica y diferente al resto de las células de otros tejidos. La morfología de los macrófagos

se ve afectada por la activación inmunológica, estados de enfermedad y tratamientos medicamentosos (quimiofarmacéuticos).

La forma y la complejidad de la morfología superficial de la membrana celular de los macrófagos, son resultado de un proceso activo que depende principalmente del citoesqueleto celular. Los microfilamentos y los microtúbulos deben estar intactos para permitir la extensión y ondulación de la membrana celular.

En cuanto a la morfología celular de los macrófagos, la mayoría de los autores consideran dos tipos principales de células: 1) Células redondeadas y 2) Células extendidas o planas.

Las características principales que se observan en la superficie de la membrana celular son: a) Lamelopodia: ondulaciones de la membrana o festones, b) Filopodios: extensiones citoplasmáticas, de diferentes longitudes, de la membrana, c) Microvellocidades: proyecciones pequeñas regulares o irregulares (Parakkal et al., 1974).

Diversos autores informan que los macrófagos pulmonares, de diferentes especies, recién obtenidos por medio de lavados traqueobronquiales, presentan un porcentaje promedio de 50-55% de células extendidas o planas. Pero que después de aproximadamente 24 hrs. de cultivo in vitro, los macrófagos se observan de mayor tamaño y aumenta el porcen-

taje de células extendidas (Polliack y Gordon,1975; Davis et.al.,1979; Finch et.al.,1980; McLennan y De Young,1984; Zmener,1984; Fetisov y Gasimova,1985).

Los cambios morfológicos parecen estar acompañados de cambios funcionales, puesto que se ha observado un aumento en la actividad fagocítica de las poblaciones de macrófagos que han estado por más de 24 hrs, en mantenimiento in vitro (Polliack y Gordon,1975; Zmener,1984). Mayer y Lamm (1984), consideran que esto es debido a una activación in vitro de tales células, provocada quizás por los residuos de LPS presentes en el suero fetal bovino utilizado con frecuencia para el mantenimiento del monoestrato. Estos mismos autores, así como Polliack y Gordon (1975), mencionan que el incremento en las funciones de los macrófagos activados depende en parte de su membrana plasmática donde se localizan los receptores no específicos y específicos que promueven la ingestión de partículas ajenas al organismo huésped. Entre estos receptores se mencionan los receptores para Fc y para complemento.

Cuando los macrófagos se ven expuestos a sustancias tóxicas o irritantes, tales como agentes químicos o bien son poblaciones que provienen de humanos fumadores, la morfología superficial de su membrana plasmática se ve alterada y presenta menor grado de lamelopodia y aún, llegan a observarse células lisas. Se observan también prolongaciones



irregulares de la membrana en forma bulbar y perforaciones o huecos, al observarse al microscopio electrónico de barrido (Davis et al., 1979; Fetisov y Gasimova, 1985).

## OBJETIVOS

Tomando en cuenta los antecedentes respecto a los factores de virulencia que presenta Actinobacillus pleuropneumoniae, y deseando ampliar los conocimientos respecto a la producción de factores citotóxicos solubles presentes en los filtrados de cultivo, se decidió:

- a) Evaluar, en monoestratos de macrófagos alveolares de cerdo, la producción de factores tóxicos solubles por diferentes serotipos de la bacteria, eligiendo para ello los serotipos 1, 3, 5, 6 y 7.
- b) Evaluar la producción de tales factores durante las fases de crecimiento bacteriano. Fase log temprana, fase log tardía y fase estacionaria temprana.
- c) Averiguar la estabilidad al calor que tales factores tempranos presenten.

## MATERIALES Y METODOS

### I.- MATERIALES.

a) Cepas bacterianas. Se utilizaron cepas de cinco serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae, cedidas por el Dr. C. Pijoan (Universidad de Minnesota, Vet.med./An.Sci. Bldg.), serotipo 1 (cepa 4074), serotipo 3 (cepa 1421), serotipo 5 (cepa k-17), serotipo 6 (cepa FEMØ), serotipo 7 (cepa WF83) y una cepa no virulenta de serotipo 1 (cepa Bes-1).

b) Sueros de referencia. Serotipos 1 al 7, facilitados por el Dr. Pijoan.

c) Medios de cultivo bacteriano. Agar BHI y caldo BHI (DIFCO Lab., Michigan, Detroit, U.S.A.) suplementado con 10% de extracto de levadura, 10 mg/lt de NAD (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, U.S.A. 63178) y 5% de suero inactivado de equino. Agar sangre (5-10% de sangre de ovino).

d) Medios de cultivo celulares. RPMI-1640 (SIGMA Chemical Co, St. Luis, MO?U.S.A. 63178) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO Lab., Grand Island, N.Y., U.S.A. 14072) suplementado con penicilina-estreptomina (5 mcg/ml) y fungizona 2.5 mg/ml (GIBCO Lab., Grand Island, N.Y., U.S.A. 14072).

e) Soluciones. PBS (Buffer de fosfatos salinos, pH= 7.2); Sol. de NaOH (0.1 N), sol. de Tripan azul 1:20 (GIBCO). Buffer HEPES (Ac, N-2 hidroxietilen piperazina N-2 etano sulfónico).

## II.- METODOS.

a) Curvas de crecimiento, Se estandarizaron las curvas de crecimiento de la cepa Bes-1, y las correspondientes a los serotipos 1, 3 y 5. Inoculando  $10^7$  Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de la bacteria correspondiente en matraces que contenían 400 ml de medio líquido BHI suplementado, los matraces se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en agitación. Se tomaron alícuotas a las 2, 4, 7, 8 y 18 hrs. del crecimiento bacteriano, y se leyeron absorbancias a 540 nm en espectrofotómetro. Al mismo tiempo se sembraron placas por duplicado de diluciones logarítmicas del cultivo para obtener cuentas viables de las 2, 4 y 8 hrs. Se realizaron las gráficas correspondientes.

b) Preparación de los sobrenadantes de cultivo, A las seis cepas se les verificó serotipo mediante la prueba de aglutinación en placa con los antisueros correspondientes. Se verificó la pureza de cada cepa, mediante resiembras en agar sangre y agar BHI. Se procedió a inocular con  $10^7$  UFC en matraces de 400 ml de caldo BHI suplementado, incubándose a  $37^\circ\text{C}$  con agitación.

En base a absorbancias leídas espectrofotométricamente se tomaron alícuotas aproximadamente a las 4, 8 y 18 horas del crecimiento bacteriano ( $A_1 = 0.3$ ,  $A_2 = 0.8$  y  $A_3 = 0.95$ ) en condiciones de esterilidad. Estas alícuotas se depositaron en tubos de centrifuga esteriles desechables y fueron centrifugadas durante 20-30 min, a 3000 rpm. Posteriormente, se

separaron los sobrenadantes y se les ajustó el pH a 7-7.2, en los casos necesarios, con sol. de NaOH (0.1 N) esteril, para después ser pasados a través de filtros de 0.22 micras (Millipore, Co.), excepto en el ensayo 4; separando cada sobrenadante en 3 alicuotas que fueron procesadas como sigue:

- 1) Tratamiento con calor a 56°C durante 30 minutos.
- 2) Tratamiento con calor, 100°C durante 10 min..
- 3) Refrigeración, inmediatamente después de obtener los filtrados, a 4°C, también se refrigeraron los filtrados de los incisos 1 y 2, después de ser tratados con calor, Ningún filtrado se utilizó después de 48 hrs. de refrigeración.

Del paquete celular obtenido del centrifugado se tomó una asada para verificar la pureza del cultivo, así mismo se tomó una muestra del filtrado para verificar esterilidad, mediante sembrado en placas de agar sangre.

c) Macrófagos alveolares de cerdo (MAC), Se sacrificaron cuatro lechones clínicamente sanos de aprox. 5 semanas de edad. Provenientes de la granja de la Universidad de Minnesota, libre de Actinobacillus pleuropneumoniae. Los animales se anestesiaron mediante la aplicación IM de 2-3 ml de Azaperona (Stressnil, Pittman Moore), seguido de 3 ml aprox. de sol. de barbituratos ,IV. Una vez anestesiados se les sacrificó por sangrado y se retiraron los pulmones cuidadosamente, anudando con un cordel la laringe para evitar contaminación por vía traqueal. Se retiró el corazón y el conducto digestivo. Se

lavaron exteriormente los pulmones y se seccionó la tráquea en su primer tercio. Los pulmones se llenaron a través de la tráquea con Sol. PBS (pH=7.2, esteril y fría) ayudándose con una jeringa de 60 ml adaptada a un tubo látex. Se usaron en cada caso 150-180 ml de PBS. Se dio a los pulmones un breve masaje manual y por decantación se recobró la sol. de PBS en botellas de vidrio esteriles. La operación se repitió dos veces en todos los casos, con la mayor asepsia posible. El líquido del lavado pulmonar se colocó en tubos plásticos de centrifuga estériles y se centrifugaron durante 5 min. a

1000 rpm. a 4°C, en centrifuga refrigerada. Posteriormente se decantó el sobrenadante y el paquete resultante se resuspendió en PBS fresco para lavar las células. El lavado se repitió una vez más y finalmente las células se resuspendieron en medio RPMI suplementado.

De esta última suspensión se realizó la cuenta de células, usando un hemocitómetro, para ajustar la concentración celular a  $2 \times 10^6$  cél/ml.

El cultivo de macrófagos se realizó en placas plásticas para cultivo celular (Costar de 24 pocetas con diámetro de 16 mm). En cada poceta se colocó 1 ml de la suspensión celular y las placas se incubaron en estufa de CO<sub>2</sub> (5% v/v) a 37°C con humedad controlada, durante 2-3 hrs. para permitir la adherencia de los macrófagos al fondo plástico. Transcurridas las 3 hrs. se eliminó el medio que contenía las células no adherentes, se lavaron las pocetas con PBS esteril

2 veces y se adicionó finalmente medio RPMI. Posteriormente se incubó en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24-48 hrs.

d) Exposición de la monocapa de macrófagos a los sobrenadantes de cultivo. A los cultivos de macrófagos de 24-48 hrs. de incubación se les decantó el medio de cultivo y se lavaron con PBS esteril. Después de eliminar el PBS, se colocó el sobrenadante de cultivo de A. pleuropneumoniae correspondiente hasta un décimo del volumen final (0,1 ml del sobrenadante). Cada sobrenadante se probó por triplicado. Así mismo, se incubaron placas testigo con medio BHI (similar al utilizado para crecer a la bacteria) y PBS esteriles por triplicado por caja. Las cajas del cultivo celular se incubaron durante 30 min. a 37°C y posteriormente se les adicionó medio RPMI fresco (aprox. 0,9 ml); volviéndose a incubar en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante tiempos preestablecidos. Transcurrido el tiempo de incubación se decantó el medio y se lavó con PBS. Se agregaron 2-3 gotas de sol. de Tripan azul (1:20) a cada poceta y se observó en microscopio invertido.

Se hicieron cuentas diferenciales de aprox. 200-300 células en un campo constante de 10 mm X 10 mm utilizando un objetivo con escala (A.O, 478, de 21,9 mm de diámetro). Las células permeables al colorante se interpretaron como no viables y a las células no teñidas como viables. Se contaron las células presentes en las pocetas testigo, considerando al número de células viables en el campo preestable-

cido como valor 100. Se contaron de la misma manera el número de células viables en las pocetas tratadas y obteniendo por diferencia con el promedio de las pocetas testigo, el número de células muertas .

e) Preparación de muestras para microscopia electrónica de barrido. En tubos de Leighton de vidrio, que contenían un cubreobjeto rectangular marcado mediante un corte en uno de sus vértices, se colocaron 1.5-2 ml de la suspensión de macrófagos ( $2 \times 10^6$  células/ml) y se incubaron durante 2-3 hrs. a  $37^\circ\text{C}$  en estufa de  $\text{CO}_2$ . Transcurrido el tiempo de incubación se decantó el medio de crecimiento y se lavó con PBS esteril para eliminar las células no adherentes. Se adicionó medio RPMI fresco y se incubaron hasta alcanzar 24 hrs. de mantenimiento in vitro. Después de eso los monoestratos se expusieron a los sobrenadantes de 4 y 8 hrs. de crecimiento de A. pleuropneumoniae de los serotipos 1 y 5 y se tomaron muestras a diferentes tiempos: 1, 2, 4, 6 y 8 horas de incubación con cada sobrenadante. Los cubreobjetos conteniendo los monoestratos tratados, así como la muestra testigo, se lavaron con Buffer HEPES frío ( $4^\circ\text{C}$ ) y se fijaron en glutaraldehído al 1%. Posteriormente las muestras fueron lavadas en buffer de fosfatos durante toda la noche y posfijadas con Osmio al 1% ( $\text{OsO}_4$ , Stevens Metallurgical Corp, N.Y. 10021) en buffer durante 30 min. Acto seguido, se lavó con agua destilada durante 2 min. en cinco oportunidades para posteriormente



sumergirlas en una solución saturada de Tiocarbhidrazina (TCH, Polyscience, Valley Road, Warrington, PA) durante 20 min. Se repitió el lavado y se utilizó posteriormente una sol. acuosa de Osmio al 1% durante 30 min., para lavar de nuevo con agua destilada por 20 min. Se repitió la solución saturada de TCH por 20 min., se lavó y por último se usó sol. acuosa de Osmio al 1% por 30 min., para lavar después con agua destilada durante 20 min, con cinco cambios.

La deshidratación se llevó a cabo con acetona al 25, 50, 70, 95 y 100% sucesivamente, con tiempos de cinco minutos en cada caso y con tres cambios de 10 min. en acetona al 100%. Seguidamente se realizó la deshidratación a punto crítico y las muestras se colocaron en soportes para ser cubiertas con vapores de oro-paladio (Malick y Wilson, 1975; Bill y Revel, 1980).

Se realizaron diferentes ensayos en los que se manejaron las variables: diferentes serotipos de A. pleuropneumoniae, sobrenadantes de diferentes horas de cultivo, con o sin tratamiento térmico y diferentes tiempos de exposición de los macrófagos.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Ensayo A. Exposición de macrófagos durante diferentes tiempos a los sobrenadantes de distintas horas de cultivo de A. pleuropneumoniae serotipos 3 y 5.

- a) Los macrófagos se expusieron por 5, 15 y 30 min., así como por 1, 2, 4, 6, 8 y 18 horas. Se utilizaron sobrenadantes del serotipo 3 y 5, sin tratamiento térmico, de cuatro horas de cultivo (A.p. 3/4h, A.p. 5/4h)
- b) Los macrófagos se expusieron durante 2, 4 y 8 hrs. a sobrenadantes de cultivo de 8 y 18 horas, de los serotipos 3 y 5 (Ap3/8h, Ap3/18h; Ap5/8h y Ap5/18h).

Ensayo B. Se expusieron macrófagos durante 18 hrs. a sobrenadantes de los serotipos 1, 3, 5, 6 y 7 de 4, 8 y 18 hrs. de cultivo, con y sin tratamiento térmico (56°C/30 min).

Ensayo C. Se expusieron macrófagos durante 18 hrs. a los sobrenadantes de los serotipos 1 y 5 de 4, 8 y 18 hrs. de cultivo, tratados a 100°C/10 min.

Ensayo D. Se expusieron los macrófagos durante 18 hrs. a diluciones de sobrenadantes de 8 hrs. de cultivo, de los serotipos 1 y 5, con o sin tratamiento térmico (56°C/30 min).

Ensayo E. Microscopia electrónica de barrido. Se procesaron muestras de monoestratos de macrófagos alveolares de cerdo (MAC) expuestos durante diferentes tiempos, a sobrenadantes de 4 y 8 horas de cultivo bacteriano de los serotipos 1 y 5, para su observación al microscopio electrónico de barrido.

Análisis Estadístico. Se realizaron análisis estadísticos de Varianza y "t" de Student, para determinar la posible existencia de diferencias significativas entre tratamientos.

## RESULTADOS

Ensayo A. Exposición de MAC a sobrenadantes de los serotipos 3 y 5 de A. pleuropneumoniae durante diferentes tiempos. Se observó que el efecto citocida de los filtrados de cultivo es dependiente del tiempo de exposición. El sobrenadante del serotipo 5 provocó menor porcentaje de mortalidad que el serotipo 3. Estos resultados se muestran en el Cuadro III.1.

Ensayo B. La exposición de macrófagos durante 18 horas a sobrenadantes de filtrados de aproximadamente 4, 8 y 18 hrs. de cultivo de A. pleuropneumoniae, serotipos 1, 3, 5, 6 y 7, así como de la cepa Bes-1; evidenció que en la primera recolección la cepa Bes-1 del serotipo 1, provocó menor porcentaje de mortalidad en los MAC que las cepas restantes. Para el segundo sobrenadante recolectado, el serotipo 5 fue el que presentó menor citotoxicidad, en comparación con los otros serotipos. Finalmente, en la recolección de los últimos sobrenadantes se observó que los serotipos 1 y 3 provocaban una mayor citotoxicidad que los serotipos 5, 6 y 7; todas estas diferencias fueron altamente significativas (p 0.01), Cuadro III.2.

Sensibilidad al calor. Los ensayos con los sobrenadantes de los serotipos 1, 5, 6 y 7 sugieren la producción de factor(es) tóxico(s) de naturaleza termolábil, ya que su actividad fue significativamente disminuida cuando se les expuso a trata-

Cuadro III.1 Porcentajes de Mortalidad de MAC expuestos durante diferentes tiempos a sobrenadantes de 4, 8 y 18 horas de cultivo de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipos 3 y 5.

	5'	15'	30'	1h	2h	4h	6h	8h	18h
Ap3/4h	0a	0	0	0	0	15	20.1	19.3	88.4
Ap3/8h	-	-	-	-	8.5	2.0	-	99.7	
Ap3/18h	-	-	-	-	3.9	42.7	-	88.8	
Ap5/4h	0	0	0	0.3	8.5	2.0	9.6	0.1	68
Ap5/8h	-	-	-	-	61.8	66.3	-	67.9	
Ap5/18h	-	-	-	-	21.3	45.4	-	36.5	

MAC = Macrófagos Alveolares de Cerdo.

(-)= Datos no recabados.

Ap3/4h = Sobrenadante del serotipo 3 de A. pleuropneumoniae, colectado a las 4 h.

Ap3/8h = Sobren. del serotipo 3 de A. pleuropneumoniae, colectado a las 8 h.

Ap3/18h = Sobren. del serotipo 3 de A. pleuropneumoniae, colectado a las 18h.

Ap5/4h = Sobrenadante del serotipo 5 de A. pleuropneumoniae, colectado a las 4h.

Ap5/8h = Sobren. del serotipo 5 de A. pleuropneumoniae, colectado a las 8h.

Ap5/18h = Sobren. del serotipo 5 de A. pleuropneumoniae, colectado a las 18h del crecimiento bacteriano.

miento térmico de 56°C durante 30 minutos. La actividad citocida para MAC, de estos sobrenadantes se observó significativamente disminuida ( $p < 0.05$ ), en la mayoría de los casos, Cuadro III.3. En el caso del serotipo 3, este parece producir un factor citocida termoestable que se expresa durante las primeras 18 hrs. de su crecimiento in vitro, ya que no hubo disminución en el porcentaje de mortalidad de MAC por el tratamiento térmico.

En los resultados que se resumen en el cuadro II I.2, también se aprecian las diferencias en producción de factor(s) tóxico(s) de cada serotipo durante sus fases de crecimiento in vitro:

- 1.- El serotipo 1, cepa virulenta, no muestra diferencias en producción de factor(es) tóxico(s) termolábil(es) durante las primeras 18 horas de su crecimiento.
- 2.- La cepa avirulenta Bes-1, del serotipo 1 sólo mostró menor citotoxicidad en el sobrenadante correspondiente a la primera recolección de 4 horas de cultivo.
- 3.- El serotipo 3, no muestra diferencias significativas en la producción de factor(es) tóxico(s) termoestable(s) durante los diferentes tiempos de recolección.
- 4.- Los serotipos 5, 6 y 7 muestran diferencias altamente significativas en la producción del factor tóxico a las 18 horas de su crecimiento, que contrasta con la menor producción de las primeras horas (4 y 8 horas).

Cuadro III.2 Porcentajes Promedio de Mortalidad de MAC expuestos a sobrenadantes de diversos serotipos de A. pleuropneumoniae.

Serotipo	4 Hrs.	8 Hrs.	18 Hrs.
1	99.6 <sup>A1a2</sup>	99.4 <sup>Aa</sup>	96.5 <sup>Aa</sup>
Bes-1	70.6 <sup>Bb</sup>	100 <sup>Aa</sup>	95.4 <sup>Aab</sup>
5	100 <sup>Aa</sup>	89.8 <sup>Ba</sup>	18.0 <sup>Bb</sup>
6	98.8 <sup>Aa</sup>	97.7 <sup>Aa</sup>	3.1 <sup>Bb</sup>
7	99.6 <sup>Aa</sup>	97.8 <sup>Aa</sup>	22.5 <sup>Bb</sup>
3	100 <sup>Aa</sup>	99.0 <sup>Aa</sup>	99.5 <sup>Aa</sup>

Diferencias en la producción de factor tóxico temprano de A. pleuropneumoniae y diferencias en su producción durante las primeras 18 Hrs. de cultivo in vitro, entre serotipos.

- 1.- A, B: Valores con diferentes mayúsculas en el superíndice, en la misma columna, presentan diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ).
- 2.- a, b : Valores con superíndices iguales en el mismo renglón no muestran diferencias altamente significativas ( $p > 0.01$ ).

Cuadro III.3 Porcentaje de Citotoxicidad de los Sobrenadantes de A. pleuropneumoniae para MAC y su labilidad al calor (56°C/30min.)

Serotipo	Sobrenadantes de cultivo de:			
	4 Hrs.	8 Hrs.	18 Hrs.	
1	99.6 <sup>A</sup> <sub>1</sub>	99.4 <sup>A</sup>	96.5 <sup>A</sup>	S/T
	53.8 <sup>Ba</sup> <sub>2</sub>	39.9 <sup>Bac</sup>	9.1 <sup>Bbc</sup>	C/T
Bes-1	70.6 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	95.4 <sup>A</sup>	S/T
	6.5 <sup>Ba</sup>	36.3 <sup>Bb</sup>	8.5 <sup>Ba</sup>	C/T
5	100 <sup>A</sup>	89.8 <sup>A</sup>	18.0 <sup>A</sup>	S/T
	11.2 <sup>Ba</sup>	8.0 <sup>Ba</sup>	6.7 <sup>Aa</sup>	C/T
6	98.8 <sup>A</sup>	97.7 <sup>A</sup>	3.1 <sup>A</sup>	S/T
	7.1 <sup>Ba</sup>	12.9 <sup>Ba</sup>	11.3 <sup>Aa</sup>	C/T
7	99.6 <sup>A</sup>	97.8 <sup>A</sup>	22.5 <sup>A</sup>	S/T
	0.0 <sup>Ba</sup>	29.3 <sup>Ba</sup>	15.7 <sup>Aa</sup>	C/T
3	100 <sup>A</sup>	99.0 <sup>A</sup>	99.5 <sup>A</sup>	S/T
	97.7 <sup>Aab</sup>	100 <sup>Aa</sup>	99.2 <sup>Ab</sup>	C/T

Sensibilidad al calor (56°C/30 min), del factor citotóxico: Sin Tratamiento Térmico (S/T), Con Tratamiento Térmico (C/T)

- 1.- A, B: Valores con diferentes mayúsculas en el superíndice, en la misma columna, presentan diferencias significativas (p<0.05).
- 2.- a, b, c: Valores con superíndices iguales en el mismo renglón no muestran diferencia significativas (p 0.05).



Cuadro III.3 Porcentaje de Citotoxicidad de los Sobrenadantes de A. pleuropneumoniae para MAC y su labilidad al calor (56°C/30min.)

Serotipo	Sobrenadantes de cultivo de:			
	4 Hrs.	8 Hrs.	18 Hrs.	
1	99.6 <sup>A</sup> <sub>1</sub>	99.4 <sup>A</sup>	96.5 <sup>A</sup>	S/T
	53.8 <sup>Ba</sup> <sub>2</sub>	39.9 <sup>Bac</sup>	9.1 <sup>Bbc</sup>	C/T
Bes-1	70.6 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	95.4 <sup>A</sup>	S/T
	6.5 <sup>Ba</sup>	36.3 <sup>Bb</sup>	8.5 <sup>Ba</sup>	C/T
5	100 <sup>A</sup>	89.8 <sup>A</sup>	18.0 <sup>A</sup>	S/T
	11.2 <sup>Ba</sup>	8.0 <sup>Ba</sup>	6.7 <sup>Aa</sup>	C/T
6	98.8 <sup>A</sup>	97.7 <sup>A</sup>	3.1 <sup>A</sup>	S/T
	7.1 <sup>Ba</sup>	12.9 <sup>Ba</sup>	11.3 <sup>Aa</sup>	C/T
7	99.6 <sup>A</sup>	97.8 <sup>A</sup>	22.5 <sup>A</sup>	S/T
	0.0 <sup>Ba</sup>	29.3 <sup>Ba</sup>	15.7 <sup>Aa</sup>	C/T
3	100 <sup>A</sup>	99.0 <sup>A</sup>	99.5 <sup>A</sup>	S/T
	97.7 <sup>Aab</sup>	100 <sup>Aa</sup>	99.2 <sup>Ab</sup>	C/T

Sensibilidad al calor (56°C/30 min), del factor citotóxico: Sin Tratamiento Térmico (S/T), Con Tratamiento Térmico (C/T)

- 1.- A, B: Valores con diferentes mayúsculas en el superíndice, en la misma columna, presentan diferencias significativas (p<0.05).
- 2.- a, b, c: Valores con superíndices iguales en el mismo renglón no muestran diferencia significativas (p 0.05).

Ensayo C. Los sobrenadantes de los serotipos 1 y 5 tratados a 100°C durante 10 minutos redujeron su actividad citotóxica sobre MAC (Cuadro III,4).

Ensayo D. Al exponer los monoestratos a diferentes diluciones de sobrenadantes de A. pleuropneumoniae serotipos 1 y 5 (con y sin tratamiento térmico, 56°C/30 min), se encontró que el efecto citotóxico se ve disminuido al aumentar la dilución de los sobrenadantes probados pero, aún en la dilución 1:64 se observa cierto efecto citocida (Cuadro III.5).

Ensayo E. Microscopia electrónica de barrido. Las observaciones al microscopio electrónico de barrido de monoestratos de macrófagos incubados a diferentes tiempos, permitieron constatar que la evolución morfológica de los MAC parece iniciarse con una célula redonda, compacta, cubierta con múltiples vellosidades. Las células que se adaptan al medio de cultivo artificial, comienzan gradualmente a emitir prolongaciones de membrana gruesas, cortas o alargadas, cubiertas de vellosidades, que les confieren a la superficie un aspecto plegado u ondulado. Las células que se extienden adquieren formas irregulares y pueden presentar alrededor festones u olones (lamelopodios) transparentes. En estas células son comunes, particularmente al inicio del cambio, las prolongaciones filiformes de membrana largas y delgadas (filopodios). Finalmente las células se extienden sobre la superficie, presentando forma irregular, se observan trans-

Cuadro III.4 Porcentajes de Mortalidad Promedio de MAC tratados con sobrenadantes expuestos a 100°C durante 10 minutos.

Serotipo	Sobrenadante de :		
	4 hrs	8 hrs	18 hrs
Ap 1	18,7	15,0	8,5
Ap 5	0,0	11,3	17,8

Ap 1 = Sobrenadante de A. pleuropneumoniae serotipo 1,

Ap 5 = Sobrenadante de A. pleuropneumoniae serotipo 5,

Cuadro III.5 Porcentaje de Mortalidad promedio de MAC expuestos a Diluciones seriadas de sobrenadantes de 4 hrs. obtenidos por centrifugación

Dilución	Ap1	Ap1/T	Ap5	Ap5/T
1:1	98,0 %	43,4 %	98,2 %	43,9 %
1:2	97,6	40,7	96,2	3,9
1:4	86,5	22,6	92,7	22,4
1:8	55,1	28,7	63,0	21,5
1:16	22,1	32,3	45,0	20,1
1:32	23,5	26,2	3,0	15,3
1:64	16,5	37,3	20,0	14,0

Ap1 = Sobrenadante de A. pleuropneumoniae serotipo 1,

Ap5 = Sobrenadante de A. pleuropneumoniae serotipo 5,

Ap1/T = Sobr. de A.p. Serotipo 1 tratado a 56°C durante 30 min.,

Ap5/T = Sobr. de A.p. Serotipo 5 tratado a 56°C durante 30 min.

Cuadro III.6 Efecto de los sobrenadantes de Actinobacillus pleuropneumoniae, serotipos 1 y 5 sobre la morfología de los MAC, observaciones al Microscopio electrónico de barrido.

-----  
 Tiempos de exposición de MAC a sobrenadantes:

Serotipo/ tiempo de incubación	1hr		2hrs		4hrs		6hrs		8hrs	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1/4h	89.9*	10.1	71.3*	28.7	81.8*	18.2	86.5*	13.5	98.1*	1.9
1/8h	61.0	39.0	59.2	40.8	86.0*	14.0	96.0*	04.0	63.1*	36.9
5/4h	62.7*	37.3	76.0*	24.0	68.6*	31.4	67.3*	32.7	73.5*	26.5
5/8h	84.2*	15.8	67.5*	32.5	71.4*	28.6	70.2*	29.8	96.2*	03.8

-----  
 Porcentajes Promedio de células redondeadas con pili (I) V.S. células planadas con ondulaciones (II). Testigo: 49.3% (I), y 50.7% (II).

(\*) = Diferencias significativas (p 0,05), con respecto a los monoestratos testigo.

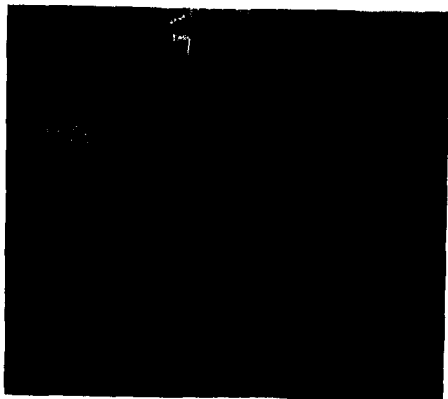
parentes y con pliegues notorios en la superficie (lamelopodios).

Para fines prácticos se consideró que la morfología celular presentada por los MAC se encontraba principalmente dentro de dos tipos : 1) Células redondeadas con vellosidades. 2) Células aplanadas con ondulaciones o festones (lamelopodios). Se valoró el efecto de los sobrenadantes de los serotipos 1 y 5, mediante la obtención de porcentajes relativos promedio de cada uno de estos tipos celulares (cuatro observaciones), Cuadro III,6 y fotografías. En las fotografías se observa:

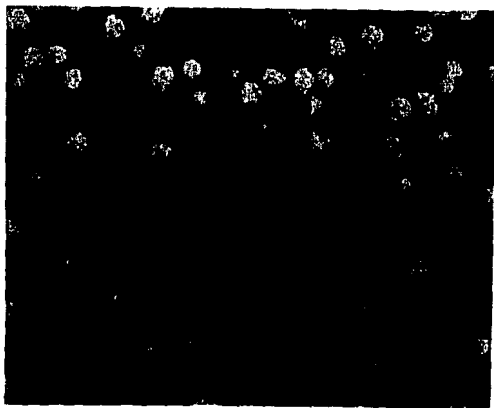
- a) Fot. 1 Monoestrato Testigo de MAC, se ve claramente una población mixta de células, donde observamos tanto células redondeadas como células planas.
- b) Fot.2 Monoestrato Testigo, las células redondeadas muestran una membrana con pili y algunos filipodios. Las células aplanadas muestran abundante lamelopodia.
- c) Fots.3 y 4 Monoestratos expuestos a sobrenad. del ser.5 de A.p./4h, muestran menor porcentaje de células aplanadas y las células redondeadas presentan menor cantidad de microvilli.
- d) Fots.5 y 6 Monoestratos de MAC expuestos a sobrenad. del ser.1 de A.pl/4h y A.p.1/8h, Las células han perdido la mayoría de sus características morfológicas de membrana.
- e) Fots. 7 y 8 Monoestratos de MAC expuestos a sobrenad. del A.p.5/8h. Se observa menor porcentaje de células aplanadas y estas células muestran una menor lamelopodia en su membrana.



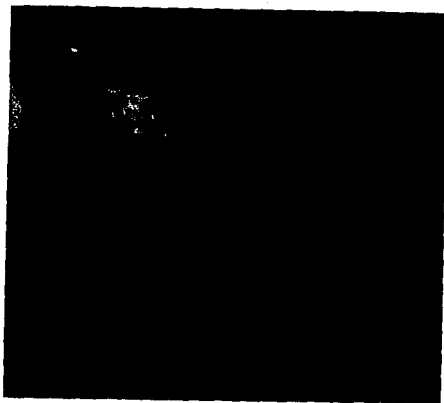
Fotografía Núm.1 Monoestrato de Macrófagos Alveolares de Credo (MAC),  
Muestra Testigo, células mantenidas durante 48 horas en medio RPMI-1640  
y expuestas a medio BHI suplementado durante 1 hora. Mag.  $1 \times 10^3$ .



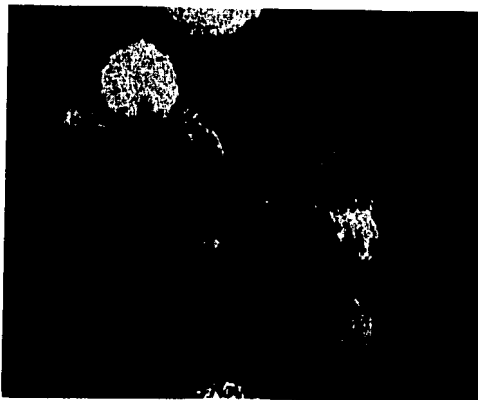
Fotografía Núm.2 Monoestrato de MAC, Testigo, RPMI-1640/48 hrs. y  
BHI/1hr. Mag.  $1.6 \times 10^3$ .



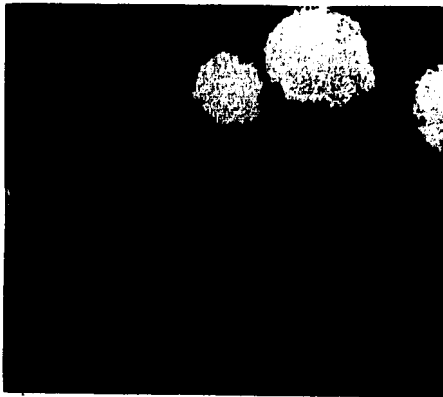
Fotografía Núm.3 Monoestrato de MAC, expuestos durante 2 horas a sobrenadante de cultivo de A. pleuropneumoniae serotipo 5 de 4 hrs. de crecimiento. Mag.1.  $\times 10^3$ .



Fotografía Núm.4 Monoestrato de MAC, expuestos durante 6 horas a sobrenadante de cultivo de A. pleuropneumoniae serotipo 5 de 4 hrs. de crecimiento. Mag.  $1.6 \times 10^3$ .

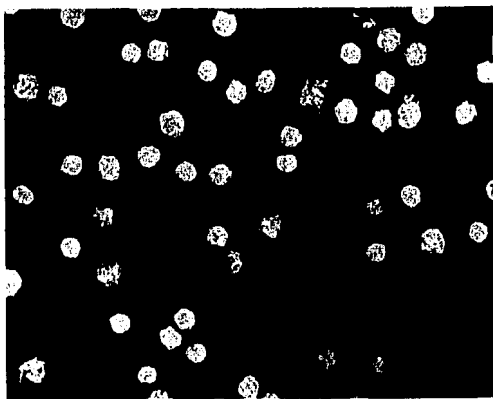


Fotografía N<sup>o</sup>.5 Monoestrato de MAC, expuestos durante 2 horas a sobrenadante de 4 hrs. de cultivo de A. pleuropneumoniae ser.1  
Mag.  $1. \times 10^3$ .

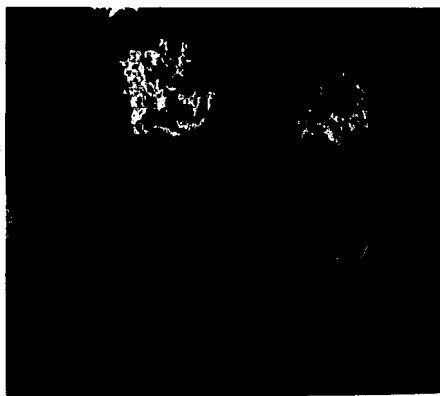


Fotografía N<sup>o</sup>.6 Monoestrato de MAC, expuestos durante 6 horas a sobrenadante de 8 hrs. de cultivo de A. pleuropneumoniae ser. 1  
Mag.  $1.6 \times 10^3$ .





Fotografía Núm.7 Monoestratos de MAC, expuestos durante 2 horas a sobrenadantes de 8 hrs. de cultivo de A. pleuropneumoniae ser.5  
Mag. 1. X 10<sup>3</sup>.



Fotografía Núm.8 Monoestrato de MAC, expuestos durante 6 horas a sobrenadante de 8 hrs. de cultivo de A. pleuropneumoniae ser.5  
Mag. 1.6 X 10<sup>3</sup>.

## DISCUSION

Actinobacillus pleuropneumoniae se caracteriza por producir graves lesiones en el tejido pulmonar del cerdo. Existen varios reportes en los que se menciona que los diversos serotipos de esta bacteria presentan diferentes grados de virulencia (Rosendal et.al.,1985). Sin embargo, aún no se han descrito con claridad los mecanismos involucrados.

Entre las sustancias involucradas figuran predominantemente el lipopolisacárido bacteriano (LPS), que posee en general una alta actividad trombogénica, activa el factor XII de la coagulación, produciendo coagulación, fibrinólisis y activación de quininas. Es además, capaz de producir una permeabilidad vascular alterada al interactuar con el sistema vascular pulmonar (Fenwick Osburn,1986f).

Los reportes que existen hasta el momento permiten suponer que el LPS de Actinobacillus pleuropneumoniae presenta estructuras similares a las observadas en otras bacterias Gram negativas. La composición química de su pared es parecida a la de otras Gram negativas variando sólo en los porcentajes de composición. Se ha reportado el uso exitoso de mutantes rugosas de E. coli (cepa J-5) en la prevención de la mortalidad por pleuroneumonía; además de disminuir notablemente el porcentaje de mortalidad también se observó menor severidad en las lesiones causadas. Las células completas

de Actinobacillus pleuropneumoniae son capaces de adsorber anticuerpos específicos contra LPS de E. coli. esto es especialmente cierto en las células provenientes de la fase logarítmica media del crecimiento bacteriano, por lo que se considera que el LPS de este Actinobacillus comparte determinantes antigénicos con el LPS de E. coli. Estos epítopes probablemente se encuentran en la parte central del LPS, y sólo se encuentran expuestos cuando las cadenas de carbohidratos más externas no se han completado.

Aparentemente la protección que confieren los anticuerpos contra LPS de E. coli, radica en la prevención o inhibición de la actividad trombogénica del LPS de A. pleuropneumoniae durante la fase temprana de la infección. Los anticuerpos probablemente contribuyen a la estimulación de la opsonización y remoción por macrófagos. La inmunización con mutantes rugosas de E. coli no previene la infección, pero la protección inespecífica temprana que provee, puede dar tiempo a la activación de las defensas específicas del huésped. Lo anterior permite ver que el LPS de A. pleuropneumoniae constituye un factor importante de virulencia, pero no explica por completo todo el cuadro patológico. Especialmente, el LPS no se asocia con lesiones necróticas y la inmunización contra esta molécula protege sólo parcialmente a los cerdos (Fenwick et.al., 1986ae).

La cápsula, es otro factor de virulencia del A.

pleuropneumoniae , probablemente le confiere protección ante la fagocitosis, posee determinantes antigénicos tipo-específicos mediante los cuales se han descrito ya doce serotipos de la bacteria, se sabe que la infección por este microorganismo confiere a los animales que se re recuperan, protección heterotípica frente a subsecuentes exposiciones. Por otro lado, la inmunización con bacterias sólo protege contra el serotipo involucrado. Aparentemente esto se debe a que el polisacárido capsular expresa sólo antígenos tipo-específicos y cepa-específicos, mientras que algunos componentes del LPS expresan además antígenos especie-específicos y antígenos comunes con otras bacterias Gram negativas. Ya antes se demostró que los cultivos jóvenes (6 hrs. de crecimiento bacteriano) proveían mejor protección que los cultivos de fase estacionaria tardía, lo cual probablemente se deba al hecho de que la bacteria en la fase logarítmica de crecimiento se halla en un período de reproducción acelerado que posiblemente permite que el cuerpo bacteriano exponga algunos de los determinantes antigénicos internos (Fenwick et,al.,1986a).

Los polisacáridos capsulares purificados han mostrado no ser por sí solos suficientemente inmunogénicos, como para que se les use en la prevención de la pleuroneumonía a pesar de que los cerdos convalescientes presentan anticueros contra el polisacárido. Aunque algunos resultados recientes demuestran que la cápsula es de hecho uno de los

principales antígenos protectivos, esta substancia al igual que el LPS sólo explica parcialmente la patología de la pleuroneumonía (Fenwick et.al., 1986c).

Las comunicaciones previas sobre la producción de factores tóxicos liberados al medio de cultivo por A. pleuropneumoniae, mencionan la presencia de factores termoestables y factores termolábiles tóxicos para macrófagos alveolares de cerdo. En el presente trabajo se abordaron algunas de las características de producción de factores tóxicos solubles producidos por diferentes serotipos de la bacteria. Se encontró que el *Actinobacillus* produce al menos un factor citocida para macrófagos, durante las primeras 18 horas del crecimiento bacteriano in vitro. Este factor citotóxico temprano es lábil al calor (56°C/30 min.) a diferencia del factor citotóxico para macrófagos reportado por Kume et.al. (1986), el cual fue obtenido a partir de sobrenadantes de cultivo de 48 horas, termoestable y compuesto principalmente por carbohidratos. Debido a esto, es posible que el factor citotóxico temprano termolábil sea diferente al reportado por Kume et.al. (1986).

Estos resultados concuerdan con los presentados por Trumper (1985), quien menciona haber detectado la producción de una toxina termolábil en el sobrenadante de 8 hrs. de crecimiento bacteriano, de una cepa del serotipo 5. Este autor probó la citotóxicidad del sobrenadante en sistemas

celulares diferentes a los macrófagos alveolares, concluyendo que se trata de un factor de características proteicas. Boyd y Rosendal (1985), también reportaron la actividad citotóxica de fracciones obtenidas a partir de sobrenadantes de A. pleuropneumoniae, que afectan principalmente a macrófagos alveolares de cerdo y cuya actividad era sensible a 120°C durante 10 min., pero resistía 60°C durante 60 min. Algunos trabajos recientes con hemolisina obtenida de cultivos jóvenes de A. pleuropneumoniae y que demuestran que esta substancia es lábil al calor y a la tripsina, hacen pensar en la probabilidad de que esta hemolisina temprana sea la misma substancia citotóxica temprana (Fedorka-Cray et.al.,1987).

Se observó que tanto la cepa virulenta como la cepa avirulenta (Bes-1) del serotipo 1 de A. pleuropneumoniae producen el factor tóxico desde las primeras horas (4 hrs.) del cultivo in vitro y que mantienen la producción aún hasta las 18 hrs. De esto resulta evidente que la producción de este factor citotóxico no es el responsable determinante de la diferencia en patogenicidad encontrada entre estas dos cepas. Cabe señalar, que en cepas del serotipo 5 se ha demostrado que la diferencia entre cepas virulentas y cepas avirulentas radica en la estructura y adhesión de la cápsula al cuerpo bacteriano. Es posible que la diferencia entre Bes-1 y la cepa virulenta del serotipo 1 también radique en la estructura capsular y no en la secreción de toxinas .

## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

En contraste con las cepas probadas del serotipo 1, en los serotipos 5, 6 y 7 la producción aparece desde las primeras 4 hrs. del crecimiento bacteriano pero, en los sobrenadantes de 18 hrs. se observa una marcada disminución en la expresión de tal toxina. esto podría explicar los diferentes grados de virulencia entre serotipos. No es claro porque la citotoxina desaparece de los cultivos de 18 hrs., algunas posibilidades que se pueden explorar en el futuro, son las que sugieren que las bacterias de estos serotipos producen una proteasa tardía que destruya a la toxina, misma que no estaría presente en las cepas del serotipo 1. Alternativamente la diferencia podría radicar en la forma en que estos serotipos responden al calcio. El serotipo 1 requiere calcio para iniciar la síntesis de la citotoxina, en tanto que otros serotipos usan el calcio durante la actividad de la citotoxina (Frey y Nicolet, 1987),

El efecto citocida, de los sobrenadantes, para MAC fue dependiente del tiempo y la dosis de exposición, además de la fase del crecimiento bacteriano.

A diferencia de lo antes mencionado para los serotipos 1, 5, 6 y 7; el serotipo 3 expresó la producción de un factor citocida para macrófagos con características de termostabilidad a 56°C durante 30 min. Dicho factor se expresó desde las primeras horas de cultivo (4 hrs.) y aún hasta las 18 hrs. No resulta claro si el serotipo 3 carece de toxina

termosensible o si esta fue enmascarada por la toxina termoestable. Resulta interesante señalar que este serotipo difiere de los demás por su baja virulencia, esta baja virulencia podría deberse a la falta de producción de toxina termolábil.

Se ha demostrado que el LPS purificado de este microorganismo no es capaz de reproducir todas las lesiones observadas en animales que sufren la infección natural, ni en aquellos en los que se induce la enfermedad en forma experimental. Sin embargo, el sobrenadante de cultivo si es capaz de reproducir la necrosis y hemorragia, en ratones inoculados intranasalmente, mientras que el previo calentamiento (100°C/10 min.) de los sobrenadantes disminuye la aparición de lesiones y no se observa necrosis (Udeze et.al., 1987); por lo que existe la posibilidad de que el factor tóxico temprano (TL) sea el responsable de la necrosis observada en las lesiones causadas por A. pleuropneumoniae en cerdos infectados.

Aún no se han realizado estudios sobre la inmunogenicidad de tal factor TL, por lo que un mejor conocimiento sobre este punto proporcionaría un resultado complementario en la búsqueda de un adecuado inmunógeno o bien del uso de fracciones inmunogénicas combinadas, capaces de prevenir la infección por A. pleuropneumoniae.

En resumen, el presente trabajo describe un factor



citotóxico termolábil temprano elaborado por la mayoría de los serotipos de Actinobacillus pleuropneumoniae. Las diferencias en secreción de este factor entre serotipos se relacionan con las diferencias observadas en su virulencia. Esto, sin embargo, no es cierto para cepas del mismo serotipo pero con diferente virulencia. Dado que este factor parece relacionarse con algunas lesiones importantes de la pleuroneumonia, es importante continuar los estudios para determinar su estructura y su antigenicidad,

LITERATURA CITADA

- Adams, D. and Edelson, P.J.(1981). The Culture of Mononuclear Phagocytes. A brief Overview. In Methods for Studying Mononuclear Phagocytes. Adams, Edelson and Koren. Academic Press Ed. Chap.1, pg:1-4.
- Badiola, J.I. y Pujols, J.(1984). Estudio sobre la Interacción de Aujezky con Pasteurella multocida en los Procesos Neumónicos del Cerdo. Tesis de Maestría en Microbiología, FES-CUAUTITLAN, U.N.A.M.
- Bell, P. and Revel, J.P.(1980). Scanning Electron Microscope Applications to Cell and Tissues in Culture. In Biomedical Research Applications of Scanning Electron Microscopy, Hodges and Halloeves Ed., Academic Press. Vol.2, Chap.1, pg:1-63.
- Bendixen, P.H., Shewen, P., Rosendal, S. and Wilkie, B.(1981). Toxicity of Haemophilus pleuropneumoniae for Porcine Lung Macrophages, Peripheral Blood Monocytes and Testicular Cell. Inf. Imm. 33(3):673-676.
- Boyd, D. and Rosendal, S.(1985), Partial purification and Characterization of Monocyte Toxin Produced by Haemophilus pleuropneumoniae. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease, Nov., Chicago. Illinois.
- Charley.B. and Frenove, B.(1980). Fc and C<sub>3</sub> Receptors of Swine Alveolar Macrophages. Res.Vet.Sci. 28:380-381.
- Davis, G.S., Brody, A.R. and Adler, K.B.(1979). Functional and Physiologic Correlates of Human Alveolar Macrophages Cell Shape and Surface Morphology. Chest, 75(2):280-282.
- Didier, P.J., Perino, L. and Urbance, J.(1984). Porcine Haemophilus Pleuropneumoniae; Microbiologic and Pathologic Findings. JAVMA 184(6):716-719.
- Diesselhoff-den, D. and Furth van (1981). Characteristics of Mononuclear Phagocytes from Different Tissues. In Methods for Studying Mononuclear Phagocytes. Adams, Edelson and Koren. Academic Press Ed. Chap.28, pg:253-272.
- Fedorca-Cray, P.J., Anderson, G.A., Huether, M.J. and Stine, D.L.(1987). Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae Haemolysin: Characterization and Protein Studies. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease. Chicago, Illinois. Proceedings pg:4.

Fenwick, B.W., Cullor, J.S., Osburn, B.I. and Olander, H.J. (1986a). Mechanisms Involved in Protection Provided by Immunization against Core Lipopolisaccharides of Escherichia coli J-5 From Lethal Haemophilus pleuropneumoniae Infections in Swine. Infect. Immun. 53(2):298-304.

Fenwick, B.W., Osburn, B.I., Cullor, J.S., Henry, S.C. and Olander, H.I. (1986b). Mortality in Swine Herds Endemically Infected with Haemophilus pleuropneumoniae: Effect of Immunization with Cross-Reacting Lipopolisaccharide Core Antigens of Escherichia coli. Am. J. Vet. Res. 47(9):1888-1891.

Fenwick, B.W., Osburn, B.I. and Olander, H.J. (1986c). Isolation and Biological Characterization of Two Lipopolisaccharide Preparation from Haemophilus pleuropneumoniae. Am. J. Vet. Res. 47(7):1433-1441.

Fenwick, B.W., Osburn, B.I. and Olander, H.J. (1986d). Resistance of C3H/HeJ Mice to the Effects of Haemophilus pleuropneumoniae. Infect. Immun. 53(3):474-479.

Fenwick, B.W. and Osburn, B.I. (1986e). Vaccine Potential of Haemophilus pleuropneumoniae Oligosaccharide-Tetanus Toxoid Conjugates. Infect. Immun. 54(2):583-585.

Fenwick, B.W. and Osburn, B.I. (1986f). Immune Response to the Lipopolisaccharides of Haemophilus pleuropneumoniae in Convalescent and Immunized Pigs. Infect. Immun. 54(2):575-582.

Fetisov, V.V. and Gasimova, Z.M. (1985). The Architectonics of the Alveolar Macrophages Surface. Arkh. Anat. Gistol. Embriol. 88(3):84-88.

Finch, G.L., Fisher, G.L., Hayes, T.L. and Golde, D.W. (1980). Morphological Studies of Cultured Human Pulmonary Macrophages. Scann. Electr. Micros. III:315-326.

Frey, J. and Nicolet, J. (1987).  $Ca^{++}$  is required for the haemolytic response of Actinobacillus pleuropneumoniae. 68th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease. Chicago, Illinois. Proceedings pg:3.

Furth van, R. (1981). Identification of Mononuclear Phagocytes Overview and Definitions. In Methods for Studying Mononuclear Phagocytes. Adams, Edelson and Koren. Academic Press Ed. Chap. 27 pg:243-251.

Furth van, R. (1985). Cellular Biology of Pulmonary Macrophages. Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 76(Suppl.1):21-27.

Gunnarsson, A., Hurvell, B. and Biberstein, E.L.(1978). Serologic Studies of Porcine Strains of Haemophilus pleuropneumoniae. Antigenic Specificity and Relationships Between Serotypes. Am. J. Vet. Res, 39(8):1286-1292.

Gunnarsson, A.(1979). Serologic Studies on Porcine Strains of Haemophilus parahaemolyticus (pleuropneumoniae). Extraction of Type-Specific Antigens. Am. J. Vet. Res, 40(4):469-472.

Henry, S.C., Parsons, D.M. and Perry, V.T.(1982). Acute Pleuropneumonia in Pigs; Clinical and Laboratory Notes. Agri-Practice, June:142-145.

Inzana, T.J.(1987). Purification and Partial Characterization of the Capsular Polymer of Haemophilus pleuropneumoniae Serotype 5. Infect. Immun. 55(7):1573-1579.

Inzana, T.J. and Mathison, B.(1987). Serotype Specificity and Immunogenicity of the Capsular Polymer of Haemophilus pleuropneumoniae Serotype 5. Infect. Immun. 55(7):1580-1587.

Jensen, A. and Bertram, T.(1986). Morphological and Biochemical Comparison of Virulent and Avirulent Isolates of Haemophilus pleuropneumoniae Serotype 5. Infect. Immun. 51(2) 419-424.

Kilian, M., Nicolet, J. and Biberstein, E.(1978). Biochemical Characterization of Haemophilus pleuropneumoniae (Matthews and Pattison, 1961), Shope 1954, and Proposal of a Neotype Strain. Int. J. Syst. Bact. 28:20-22.

Kume, K., Nakai, T. and Sawata, A.(1986). Interaction between Heat-Stable Hemolytic Substance from Haemophilus pleuropneumoniae and Porcine Pulmonary Macrophages in vitro. Infect. Immun. 51(2):563-570.

Lariviere, S., Mittal, K., Nielsen, R., Pijoan, C., Rapp, V. and Ross, R.(1987). Actinobacillus pleuropneumoniae Working Team. Meeting in Saint-Hyacinthe. Proceedings.

Leman, A., Mengeling, W., Penny, R., Scholl, E, Straw, B and Glock, R.(1986). Disease of Swine. 6a, Ed., pg:426-436.

Liggett, A.D., Harrison, L.R. and Farrell, R.L.(1987). Sequential Study of Lesion Development in Experimental Laemophilus pleuropneumonia. Res. Vet. Sci. 42(2):204-212.

Lombin, L.H., Rosendal, S. and Mitchell, W.R.(1981). Evaluation of the Complement Fixation Test for the Diagnosis of

Pleuropneumonia of Swine Caused by Haemophilus pleuropneumoniae.  
Can. J. Comp. Med. 46:109-114.

MacInnes, J.I. and Rosendal, S.(1987). Analysis of Mayor Antigenes of Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae and Related Organisms. Infect. Immun. 55(7):1626-1634.

Malick and Wilson(1975). Scanning Electron Microscopy, IITTRI Symposium. Ohm Johari Ed., pg:260-266.

Maudsley, J., Kadis, S. and Mayberry, M.(1986), Isolation, Purification and Partial Characterization of a Lipopolisaccharide from Haemophilus pleuropneumoniae, Infect. Immun. 51(2):501-506.

Mayer, P. and Lam, C.(1984), Porcine Alveolar Macrophages, Isolation, Morphological and Functional Characteristics. Zbl. Vt. Med. A. 31:59-71.

Mc Lennan, G. and DeYoung, N.(1984), The Pulmonary Alveolar Macrophages. Aust. Nz. J. Med, 14:721-730.

Mittal, K.R., Higgins, P. and Lariviere, S.(1982), Evaluation of Slide Agglutination and Ring Precipitation Tests for Capsular Serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae, J. Clin. Microbiol. 15(6):1019-1023.

Mittal, K.R., Higgins, R. and Lariviere, S.(1983). Detection of Type-Specific Antigenes in the Lung of Haemophilus pleuropneumoniae Infected Pigs by Coagglutination Test. J. Clin. Microbiol. 18(6):1355-1357.

Mittal, K.R., Higgins, R., Lariviere, S. and Leblanc, D.(1984). A 2-Mercaptoethanol Tube Agglutination Test for Diagnosis of Haemophilus pleuropneumoniae infection in Pigs. Am. J. Vet. Res. 45(4):715-719.

Mulks, M.H., Moxon, E.R., Bricker, J., Wright, A. and Plaut, A.(1984). Examination of Haemophilus pleuropneumoniae for Immunoglobulin A Protease Activity. Infect. Immun. 45(1):276-277.

Musser, J.M., Rapp, V. and Selander, R.K.(1987). Clonal Diversity in Haemophilus pleuropneumoniae. Infect. Immun. 55(5):1207-1215.

Myrvik, Q., Leake, E. and Fariss, B.(1961). Studies on Pulmonary Alveolar Macrophages from Normal Rabbit: A technique to Procure them in a High State of Purity. J. immun. 86:128-132.

Nakai, T. Sawata, A. and Kume, K. (1984). Pathogenicity of Haemophilus pleuropneumoniae for Laboratory Animals and Possible Role of its Hemolysin for Production of Pleuropneumonia. Jpn. J. Vet. Sci. 46(6):851-858.

Nicolet, J. (1971). Sur l'hémophilose du porc III. Differentiation Serologique de Haemophilus parahaemolyticus. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd Infektionskr Hyg. Abt. I Orig. 216:487-495.

Nicolet, J. (1985). Bacteriology and Epidemiology of Haemophilus pleuropneumoniae. Compendium of Haemophilus pleuropneumoniae. Roy Schultz Ed., Avoca, Iowa 51521, Pg:7-19.

Nielsen, R. and O'Connor, P. (1984). Serological Characterization of 8 Haemophilus pleuropneumoniae Strains and Proposal of a New Serotype: Serotype 8. Acta Vet. Scand. 25:96-106.

Nielsen, R. (1985). Serological Characterization of Haemophilus pleuropneumoniae Strains and Proposal of a New Serotype: Serotype 9. Acta, Vet. Scand. 26:501-512.

Nielsen, R. (1985). Serological Characterization of Haemophilus pleuropneumoniae Strains and Proposal of a New Serotype; Serotype 10. Acta, Vet. Scand. 26:581-585.

Nielsen, R. (1985). Diagnosis, Immunity and Control of Haemophilus pleuropneumoniae. Compendium on Swine Haemophilus pleuropneumoniae. Roy Schultz Ed., Avoca, Iowa, Pg:18-22.

Nielsen, R. (1986). Serological Characterization of Actinobacillus pleuropneumoniae Strains and Proposal of a New serotype: Serotype 12. Acta, Vet. Scand. 27:453-455.

Nielsen, R. (1987). Seroepidemiology of Actinobacillus pleuropneumoniae. Les Infections Respiratoires Chez le Porc. Proceedings, Montreal Canada

Nordstoga, K. and Fjølstad, M. (1967). The Generalized Schwartzman Reaction and Haemophilus Infections in Pigs. Path. Vet. 4:245-253.

Parakkal, P., Pinto, J. and Hanifin, J.M. (1974). Surface Morphology of Human Mononuclear Phagocytes During Maturation and Phagocytosis. J. Ultrastr. Res. 48:216-226.

Pennington, J.E., Rossing, T.H. and Boerth, L.W. (1983). The Effect of Human Alveolar Macrophages on the Bactericidal Capacity of Nautrophilus. J. Infect. Dis. 148(1):101-109.

Pijoan, C., Morrison, R., and Hilley, H. (1983). Dilution Technique for Isolation of Haemophilus from Swine Lungs Collected at Slaughter. J. Clin. Microbiol. 18(1):143-145.

Pijoan, C. (1985). Etiología, Inmunidad y Patogenia de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo. Med. Vet. 1(11):517-524.

Pijoan, C., Fuentes, M., y Noyes, E. (1985). Enfermedades Respiratorias Bacterianas del Cerdo; Control por Antibióticos y Vacunas en el Cerdo, reunión Anual de la Asoc. de Porcicultores (ANAPORC), Barcelona, España, Pg:63-72.

Pijoan, C. (1986). Effect of Pasteurella multocida and Haemophilus pleuropneumoniae Toxins on Swine Alveolar Macrophages. Vet. Immunol. Immunopathol. 13(1-2):141-149.

Pijoan, C. and Fuentes, M. (1987). Severe Pleuritis Associated with Certain Strains of Pasteurella multocida in Swine. JAVMA 191(7):823-826.

Pohl, S., Bertschinger, U., Frederiksen, W. and Mannheim, W. (1983). Transfer of Haemophilus pleuropneumoniae and the Pasteurella haemolytica-Like Organism Causing Porcine Necrotic Pleuropneumonia to the Genus Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae comb. nov.) on the Basis of Phenotypic and Deoxyribonucleic Acid Relatedness. J. Syst. Taxon. 33:510.

Polliack, A. and Gordon, S. (1975). Scanning Electron Microscopy of Murine Macrophages. Surface Characteristics during Maturation, Activation and Phagocytosis. Labor. Invest. 33(5):469-477.

Rapp, V., Ross, R. and Zimmermann, E. (1985a). Serotyping of Haemophilus pleuropneumoniae by Slide Agglutination and Indirect Fluorescent Antibody Test in Swine. Am. J. Vet. Res. 46(1):185-192.

Rapp, V., Ross, R. and Young, T. (1985b). Characterization of Haemophilus spp. Isolated from Healthy Swine and Evaluation of Cross-Reactivity of Complement-Fixing Antibodies to Haemophilus pleuropneumoniae and Haemophilus Taxon "Minor Group" J. Clin. Micro. 22(6):945-950.

Rapp, V., Munson, R. and Ross, R. (1986a). Outer Membrane Protein Profiles of Haemophilus pleuropneumoniae. Inf. Imm. 52(2):414-420.

Rapp, V. and Ross, R. (1986b) Antibody Response of Swine to Outer Membrane Components of Haemophilus pleuropneumoniae

During Infection. *Infect., Immun.* 54(3);751-760.

Rapp, V. (1987). Prospects for Immunization Against Porcine Pleuropneumonia, *Les Infections Respiratoires Chez le Porc*. Vet. Med. School, University of Montreal, Canada, June 22, Proceedings.

Reynolds, H.Y., Atkinson, J.P., Newball, H.H. and Frank, M.M. (1975). Receptors for Immunoglobulin and Complement on Human Alveolar Macrophages, *J. Immunol.* 114(6);1813-1819.

Rosendal, S., Mitchell, W., Weber, M., Wilson, M. and Zaman, M. (1980). Haemophilus pleuropneumoniae lung lesions induced by Sonicated Bacteria and Sterile Culture Supernatant, *Proc. Int. Pig Vet. Soc. Congres.* 5:221.

Rosendal, S. and Boyd, D. (1982). Haemophilus pleuropneumoniae Serotyping. *J. Clin. Micro.* 16(5):840-843.

Rosendal, S., Boyd, D. and Gilbride, K.A. (1985a). Comparative Virulence of Porcine Haemophilus Bacteria. *Can. J. Comp. Med.* 49:68-74.

Rosendal, S. and Mittal K.R. (1985b). Serological Cross-Reactivity Between a Porcine Actinobacillus Strain and Haemophilus pleuropneumoniae. *Can. J. Comp. Med.* 49:164-170.

Sebunya, T.N.K. and Saunders, J.R. (1983). Haemophilus pleuropneumoniae Infection in Swine: A Review. *JAVMA* 182(12):1331-1337.

Senior, R., Campbell, E. and Villiger, B. (1981). Obtaining and Culturing Human and Animal Alveolar Macrophages, In *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, Adams, Edelson and Koren. Academic Press Ed. Chap. 8, pg:69-83.

Shope, E. (1963). Porcine Contagious Pleuropneumonia. I. Experimental Transmission, Etiology and Pathology. *J. Exp. Med.* 119:357-368.

Shope, E., White, D. and Leidy, G. (1963). Porcine Contagious Pleuropneumonia. II. Studies on the Pathogenicity of the Etiological Agent, Haemophilus pleuropneumoniae. *J. Exp. Med.* 119:369-375.

Stone, B. (1984), H, pleuropneumonia Hotline, *Pig. American* October 35.

Trumper, B.B. and Joens, L.A. (1984). Studies of Haemophilus pleuropneumoniae Culture Supernatant in CF-1 mice, 65th. Annual Meeting of the Conference of Research Workers in



Animal Disease, Nov., Chicago, Illinois, Proceedings,

Trumper, B.B. (1985), Toxic Effects of Culture Supernatant Fluids of Haemophilus pleuropneumoniae in vitro and in vivo. M. on Sci. Thesis, Univ. of Arizona, U.S.A.

Udeze, F.A., Latimer, K.S. and Kadis, S. (1987), Role of Haemophilus pleuropneumoniae Lipopolisaccharide Endotoxin in the Pathogenesis of Porcine Haemophilus Pleuropneumoniae. Am. J. Vet. Res. 48(5):768-773.

Yagihashi, T., Nunoya, T., Mitui, T and Tajima M. (1984), Effect of Mycoplasma hyopneumoniae Infection on the Development of Haemophilus pleuropneumoniae Pneumonia in Pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 46(5):705-713.

Zeidler, R.B. and Kim, H.D. (1985), Phagocytosis, Chemiluminescence and Cell Volumen of Alveolar Macrophages from Neonatal and Adult Pigs. J. Leukoc. Biol. 37:29-43.

Zmener, O. (1984), Macrophages Isolated from Periapical Granuloma: A Scanning Electron Microscopic Study, Oral Surg. 58:330-335.